

MITOGENE STIMULATION
VON HÜHNERLYMPHOZYTEN
DURCH ECHINACEA ANGUSTIFOLIA
UND INFLUEX^R IN VITRO

Maja Du Moulin Eckart

Aus dem Institut für
Physiologie, Physiologische Chemie und Ernährungsphysiologie
der Tierärztlichen Fakultät der Universität München
Geschäftsführender Vorstand: Prof. Dr. H. Zucker

Angefertigt unter Leitung von
Prof. Dr. U. Lösch

MITOGENE STIMULATION VON HÜHNERLYMPHOZYTEN DURCH
ECHINACEA ANGUSTIFOLIA UND INFLUEX^R
IN VITRO

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der tiermedizinischen Doktorwürde
der Tierärztlichen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität München

von
Maja Du Moulin Eckart
aus
München

München 1986

Gedruckt mit Genehmigung der Tierärztlichen Fakultät
der Universität München

Dekan: Prof. Dr. H. Zucker

Referent: Prof. Dr. U. Lösch

Korreferent: Prof. Dr. H. Mahnel

Tag der Promotion: 25. Juli 1986

DISSERTATIONS- UND FOTODRUCK FRANK GmbH
8000 München 2, Gabelsbergerstraße 15, Tel. 2809090

Inhaltsverzeichnis

1.	Einleitung	1
1.1.	Allgemeines	1
1.2.	Historisches	2
1.3.	Botanik	3
1.4.	Inhaltsstoffe von Echinacea	4
1.5.	Eingesetzte Präparate	6
1.5.1.	Monopräparate	6
1.5.2.	Mischpräparate	6
1.6.	Pharmakologie von Echinacea	10
1.7.	Mitogene	13
1.7.1.	Allgemeines	13
1.7.2.	Wirkungsmechanismen	14
1.7.3.	Pokeweed-Mitogen	16
1.8.	Fragestellung	17
2.	Material und Methoden	18
3.	Ergebnisteil	24
4.	Diskussion	27
4.1.	Zellgewinnung und Kultivierung	27
4.2.	Diskussion der Ergebnisse	29
4.2.1.	Versuchsbewertung	29
4.2.1.1.	Dosierung der immunstimulierenden Substanzen	29
4.2.1.2.	Verwendung von Mischpräparaten	29
4.2.1.3.	Streuung der Werte	30
4.2.2.	Versuchsergebnisse	31
4.2.2.1.	Echinacea angustifolia	31
4.2.2.2.	Influe ^x	31
4.2.2.3.	Vergleichende Betrachtung	33
5.	Zusammenfassung	36
6.	Summary	37
7.	Literaturverzeichnis	38

1. Einleitung

1.1. Allgemeines

Die Immunstimulierung ist ein Verfahren bei dem versucht wird, durch Pharmaka eine Steigerung unspezifischer oder/und spezifischer körpereigener Abwehrmechanismen zu induzieren (Drews, 1980), wobei vor allem die unspezifische Stimulierung betrachtet wird, welche besonders die zellulären Abwehrmechanismen betrifft (Wagner, 1983).

Mayr et al.(1985) bezeichnen den so erlangten antigen-unspezifischen Schutz als "Paramunität" und die, diesen Schutz bewirkenden Stoffe, als "Paramunitätsinducer". Paramunitätsinducer weisen meist nur eine geringe bzw. gar keine Immunogenität auf. Ihre Wirkung ist unter anderem mitogen, d.h. sie steigern die Proliferation immunkompetenter Zellen, hinterlassen aber keine Gedächtnisreaktion (Wagner, 1983).

Nach Wagner lassen sich die immunstimulierenden Drogen in drei Gruppen einteilen:

1.) Drogen, die zu einer gesteigerten Resistenz gegen bakterielle und virale Infektionen führen, also immunstimulierend im eigentlichen Sinn sind. Sie werden auch für die Tumorbearbeitung verwendet, da dadurch Knochenmarkreserven mobilisiert werden und sich die Abwehrlage verbessert. Ihr Einsatz erfolgt sowohl prophylaktisch als auch therapeutisch.

2.) Immunsuppressor-Zellen stimulierende Drogen, anwendbar bei Autoimmunerkrankungen zur Normalisierung der überaktiven Abwehrkräfte.

3.) Drogen die adaptogen wirken, d.h. eine Resistenzsteigerung gegen schädliche Einflüsse physikalischer, chemischer oder biologischer Art herbeiführen. Die Beeinflussung betrifft vermutlich das endokrine System.

Die am häufigsten in Arzneipräparaten zur Resistenz- bzw. Umstimmungstherapie verwendeten Pflanzen gemäß der Roten Liste (1986) sind folgende:

Chamomilla recutita
Achyrocline saturoides
Aconitum napellus
Althaea officinalis
Arnica montana
Baptisia tinctoria
Bryonia dioica
Calendula officinalis
Carex flav./elog./vesic
Centaurium minus

Cyanchum vincetoxicum
Echinacea purp./angust.
Eupatorium cannabinum, perfoliatum
Euphrasia officinalis
Gelsemium sempervirens
Marrubium vulgare
Pneumus boldus
Phytolacca decandra
Scrophularia nodosa
Thuja occidentalis

Als Indikation für diese Präparate werden angegeben:
Allgemeine Resistenzsteigerung, Grippeprophylaxe, fieberhafte Bagatellinfektionen, Unterstützung der Antibiotika-, Cyto- statika- und Strahlentherapie, Therapie von leichten und chronischen Infekten des Rachenraumes und der Blase sowie die Unterstützung der Tumorabwehr.

Im Rahmen dieser Arbeit soll der mitogene Effekt von Echinacea angustifolia sowohl als Monopräparat als auch als Bestandteil eines Mischpräparates (Influe^x^R) untersucht werden.

1.2. Historisches

In der amerikanischen Volksmedizin ist Echinacea (engl.: cone-flower, dt.: Sonnenhut) schon seit langem als Antiseptikum für eitrige Wunden und bei Schlangenbiß verwendet worden. Hierzu wurde die Wurzel der Pflanze zwischen Steinen zerrieben und der so entstandene Brei auf die Wunde aufgetragen, was zu einer Beschleunigung der Heilung beitrug.

Im Jahr 1885 führte ein amerikanischer Arzt, der die Wirkung von Echinacea bei nordamerikanischen Indianern kennengelernt hatte, die Droge in die neuzeitliche Medizin ein. Durch den Widerstand der Schulmediziner, basierend auf fehlenden wis-

senschaftlichen Untersuchungen, schlug die anfängliche Euphorie in Skepsis um und Echinacea geriet als Droge in Vergessenheit. Erst um 1950 wurden pharmakologische und klinische Studien an Echinacea durchgeführt, die ihre medizinische Wirksamkeit bestätigten.

1.3. Botanik

Botanisch lässt sich die Gattung Echinacea, die zu den Korbblütlern (Compositen) zählt, in 9 Species mit mehreren Varietäten unterteilen. Daneben gibt es noch Gartenzüchtungen (syn. Rudbeckia). Beheimatet ist die Pflanze im östlichen Nordamerika und im Mississippibecken. Die Staude bevorzugt trockenen Untergrund und ist klimatisch wenig anspruchsvoll. Medizinisch verwendet werden Echinacea purpurea und angustifolia. Sie besitzen einen diploiden Chromosomensatz ($n=11$). Aus einer bodennahen Blattrosette wächst der circa 50 cm hohe Stengel der Echinacea angustifolia empor. Die ungeteilten Blätter sind lanzettartig, am Grund verschmälert und dreinervig. Der Stengel trägt jeweils nur eine kegelförmige rote Blüte, an der die Hüllblätter dachziegelartig angeordnet sind. Echinacea purpurea ähnelt sehr der Echinacea angustifolia, allerdings wird sie etwas höher und ihre Blätter sind rau und gezähnt. Der Name "Echinacea" kommt aus dem griechischen Wort "echinos", d.h. der Igel, was sich auf den igelartigen Blütenkopf bezieht.

In der Medizin wird sowohl das frische, oberirdisch blühende Kraut als auch die gesamte Wurzel verwendet. Das Wurzelsystem von Echinacea angustifolia besteht aus einer bis mehreren senkrecht in den Boden wachsenden grau- bis rotbraunen Pfahlwurzeln. Echinacea purpurea besitzt einen Wurzelstock mit vielen faserartigen weißlich-hellbraunen Wurzeln. Im Rahmen der vorliegenden Untersuchungen wurde mit dem Wurzelextrakt von Echinacea angustifolia experimentiert.

1.4. Inhaltsstoffe von Echinacea

Echinacea beinhaltet ubiquitäre Stoffe wie Fettsäuren, Ascorbinsäure, Zucker und Phytosterole. Heyl und Stanly begannen 1914 mit der chemischen Analyse der Wurzeldroge von Echinacea und fanden in ihr Inulin, inulinartige Stoffe, Pentosane, reduzierte Zucker, Harzsubstanzen und ätherische Öle, aber keine Stärke. Später identifizierten Heyl und Hart (1915) des weiteren Ölsäure, Linolsäure, Linolensäure, Cerotinsäure, Palmitinsäure. Verelis (1978) wies β -Sitosterol, Sitosterol-3 β -D-Glucosid und Stigmasterol nach. Er stellte ferner fest, daß Echinacea angustifolia- Wurzel 1.19 % ätherisches Öl enthält. Die durch Wasserdampfdestillation bzw. Extraktion in lipophilen Lösungsmitteln gewonnenen ätherischen Öle ließen eine Unterteilung in mindestens 21 Komponenten zu. Mit 61% stellt Geraniolisobutytrat den Hauptanteil dar, daneben finden sich noch 2-Undecanon, Geraniolacetat und Geraniolproprionat. Becker (1982) wies im Angustifolia-Wurzelöl Humulen nach. Schulte et al. (1967) isolierten aus der Wurzel 13 Polyacetylenverbindungen, welche im Kraut z.T. nur in Spuren, z.T. gar nicht nachgewiesen werden konnten. Allerdings sind Polyacetylene leicht durch äußere Einflüsse zerstörbar. Bohlmann und Grenz (1966) identifizierten zwei Polyinamide, welche aus Ölsäure gebildet werden. Weitere Wirkstoffe von Echinacea sind:

Tannin, Phenolsäure, Laevulose, Betain, Katalase-Oxydase und Peroxydase als Ferment; Sulfate, Karbonate, Silikate, Erdalkali, Magnesium, Eisen und Aluminium als Mineralstoffe. Zu den gesättigten Fettsäuren zählen neben der bereits erwähnten Palmitin - und Carotinsäure auch Stearin - und Myristinsäure. Keller (1955) fand zwei Faktoren, deren einer (Faktor A) eine cortisonähnliche Wirkung hat, deren anderer (Faktor B) hemmend auf Hyaluronidase wirken soll. Jakobson et al., (1975) isolierten eine insektizid wirkende Substanz, das "Echinacein", das mit den in Rutaceen vorkommenden Neoherculin und Sanshool identisch ist. Des weiteren Echinolon, eine den Insektenschlupfhormonen ähnliche Substanz. Jacobson et

al. gelang auch die Strukturanalyse des im Echinaceawurzelöl enthaltenen cis-1,8-Pentadecadien, welches 5-10% des ätherischen Öls von Echinacea ausmachen soll. In vitro zeigt es schwach onkolytische Wirkung.

1950 gelang es Stoll et al. aus der Echinacea-angust.-Wurzel eine als "Echinacosid" bezeichnete wasserlösliche, kristalline Substanz zu isolieren. Sie ist ein Triglycosid des Brenzcatechinäthanols. Die Zuckerkomponente setzt sich aus 2 Molekülen Glucose und 1 Molekül L-Rhamnose zusammen. Neben einer Bindung zum Aglykon ist die Glucose zudem mit einem Molekül Kaffeesäure verestert (Becker et al., 1982).

Echinacosid ist ein Polysaccharid, dessen anti virale und bakteriostatische Wirkung durch unspezifische Resistenzsteigerung eindeutig erwiesen ist. Es bewirkt zudem eine Stimulation von Fibroblasten (Funke, 1983).

Wagner et al. (1985) wiesen mittels Granulozyten-Test, Carbon-Clearence-Methode und T-Lymphozyten-Transformations-test eine immunstimulierende Aktivität zweier Polysaccharide des wässrigen Extraktes von Echinacea nach. Es handelt sich um ein Heteroxyylan (ca. 35000 Dalton). Es wird angenommen, daß diese Polysaccharide großen Anteil an der resistenzsteigernden Wirkung von Echinacea-Präparaten haben.

Daneben zeigen die Polysaccharide noch immunstimulierende Wirkung. So führte Whistler et al. (1976) Untersuchungen an Pilz-, Flechten- und Algen-Polysacchariden durch und konnten deren stimulierende Wirkung auf die Phagozytose, Interferon-freisetzung sowie Antitumor- und antivirale Wirkung nachweisen. Diese Polysaccharide der niedrigen Pflanzen, vorwiegend Glucane und Mannone mit Molekular-Gewichten zwischen 50 000 und 500 000, erreichen nicht die komplexe Struktur der als biologisch aktiv erkannten Polysaccharide der höheren Pflanzen. Besonders die Zusammensetzung und Struktur der Polysaccharide höherer Pflanzen unterscheiden sich stark von denen der niedrigen (Wagner 1985). Bonadeo et al. (1971) isolierten ein von ihnen als Echinacea B bezeichnetes, pseudokristallines gemischtes Polysaccharid, welches mit zelloberflächenständiger Hyaluronsäure einen Komplex eingehen

kann.

1.5. Für die vorliegenden Untersuchungen eingesetzten Stoffe

1. Monopräparat:

Das im Rahmen vorliegender Untersuchungen eingesetzte Echinacea-Monopräparat ist Echinacea Urtinktur ,extrahiert von der Firma Steigerwald. Zur Gewinnung von Echinacea-Urtinktur wurde die gesamte frische Pflanze mit Wurzel verwendet, wobei der Wurzelanteil etwa 25 % beträgt. Als Extraktionsmittel diente Methanol 30 % (v/v). Der Gehalt an Echinacosid wird vom Hersteller auf maximal 0.005 mg/ml angegeben. Echinacosid kann durch Dünnschichtchromatographie nachgewiesen werden. Das Produkt liegt in einer 25 %igen (w/v) alkoholischen Lösung vor.

2. Mischpräparate:

Neben dem Monopräparat wurde noch das Mischpräparat Influe^x getestet:

1.) Influe^x injectabile:

In der Ampulle zu 2 ml sind enthalten:

Ech. angust.	D 1	400.0 mg/ 2ml
Eupatorium perfol.	D 3	200.0 mg/ 2ml
Lachesis muta	D 10	300.0 mg/ 2ml
Gelsemium	D 3	200.0 mg/ 2ml
Vitamin C		40.0 mg/ 2ml

2.) Influe^x in wässriger Lösung (die entalkoholisierte Form der Influe^x-Tropfen:

100 ml enthalten:

Echinacea angust.	Ø	30.0 ml/100 ml
Aconitum	D 4	15.0 ml/ 100 ml
Apis mell.	D 3	10.0 ml/ 100 ml
Lachesis muta	D 6	30.0 ml/ 100 ml

Die neben Echinacea angust. enthaltenen Substanzen werden wie folgt beschrieben:

Eupatorium perfoliata

Durchwachsenblättriger Wasserhanf, gehört zur Familie der Compositae, Unterfamilie Tubuliflorae. Das Kraut kommt auf feuchten Böden in Nordamerika vor, in Europa kultiviert. Für die Tinktur wird die ganze, frische, zu Beginn der Blütezeit ohne Wurzel gesammelte Pflanze verwendet. Eupatorium diente bei den Indianern als Wechselfiebermittel, wirkt in großen Dosen emetisch und purgativ und in geringeren tonisierend und schweißtreibend. Es wird als Malariamittel in der Volksheilkunde Nordamerikas eingesetzt, gilt aber auch als wirksam bei grippalen Infekten mit undulierendem Fieber.

Inhaltsstoffe: Eupatorium perfoliata ist bisher wenig untersucht worden. Als die aktive Komponente wird ein amorpher Bitterstoff (Glykosid ?), das "Eupatorin" angesehen.

Ferner enthält Eupatorium neben Gerbsäure einen stickstoffhaltigen Anteil; ätherisches Öl soll fehlen. In den Wurzeln findet sich 5 % Inulin (Leeser, 1983). Gassinger (1981) stellte in einem vergleichenden Versuch fest, daß Eupatorium perfoliatum (D 2) und Acetylsalicylsäure bei Patienten mit grippalem Infekt gleich gut wirksam sind.

Lachesis muta

Lachesis muta, die Buschmeisterschlange, gehört zu der Familie der Crotalidae (Lochottern) und ist in Südamerika beheimatet. Ihr Gift setzt Histamin frei (Feldberg und Kellaway, 1937) und bewirkt in hoher Dosis intravaskuläre Gerinnung. In geringer Menge hemmt es die Blutkoagulation (Arthus, 1920). Im Gift wurden Enzyme, Neuro- und Cardiotoxine, sowie basische Polypeptide nachgewiesen (Wirth und Gloxhuber, 1981). Intoxikation mit Lachesis führt zu Endothel- und Lymphknotenschwellung. An den Injektionsstellen zeigen sich Erythrozyteninfiltrationen und Mikrokoagulation, in den Lymphknoten sind Erythrozyten und mononukleäre Zellen nachweisbar (Efrati et al., 1953).

Gelsemium sempervirens

Gelsemium, der gelbe Jasmin, gehört zur Familie der Loganiaceae. In der Volksmedizin wird er gegen Hämorrhoidal- und Uterusblutungen eingesetzt. Bekannt sind auch die sedativen Eigenschaften von Gelsemium, es wurde als Opiumersatz verwendet. In China diente er zu Giftmorden und bei den Indianern der Südstaaten war er als Giftpflanze mit curareartiger Wirkung bekannt. An Gelsemium kann Gewöhnung wie an ein narkotisches Genußmittel stattfinden. Die Homöotherapie setzt Gelsemium bei fieberhaften grippalen Infekten mit Schüttelfrost, Kopf- und Gliederschmerzen, Abgeschlagenheit und Katarrhen, ferner bei Migräne, Neuralgien im Kopfbereich, Augenentzündungen und Nervosität ein. Inhaltsstoffe sind: Verschiedene Alkaloide wie Gelsemicin, ein hoch toxisches Indolalkaloid, die Oxindolalkaloide (Gelsemin, Gelsevitrin und Gelsedin) sowie das dem Yohimbin ähnliche Sempervirin. Weiter Gerbstoff, Öl mit Phytosterolen und Phytosterolonen, Oxalsäure und Stärke (Leeser, 1983).

Aconitum napellus

Aconitum , der blaue Eisenhut gehört in die Familie der Ranunculaceae. Die Droge wird aus der Knolle , Tubera aconitini, gewonnen (Roth et. al., 1984). Die Hauptwirkstoffe sind hydrolisierbare Esteralkaloide von terpenoider Struktur, daneben Kaffee-, Chloragen-, China- und Äpfelsäure. Das Hauptalkaloid ist Aconitin, eines der giftigsten Alkaloide, ferner Picroaconitin, Mesaconitin, Hypaconitin sowie die freien Alkamine Aconin, Napellin, Neopellin und Neolin (Chubrasik und Chubrasik, 1983). Aconitin greift in der Peripherie an und blockiert die motorischen Endplatten. Auf der Haut wirkt es anfangs erregend, dann lähmend auf sensible Nervenendigungen bis hin zur Anästhesie (Braun, 1979). Bei akuter Vergiftung durch Aconitum treten Diarrhoe, Tremor, Hypothermie, Parästhesien sowie Lähmungserscheinungen und besonders Trigeminusschmerzen auf (Chubrasik und Chubrasik, 1983).

Apis mellifica

Apis mellifica ist das Gift der Honigbiene, ein Reizfaktor auf Eiweißbasis (Schütterle, 1970). Das aus Apis mellifica isolierte Haupttoxin, Mellitin, wirkt hämolysierend, ohne enzymatische Aktivität zu besitzen (Neumann et al., 1953). Es handelt sich um ein basisches Polypeptid mit dem Molekulargewicht von 2850 Dalton. Mellitin ist stark oberflächenaktiv, es steigert die Kapillarpermeabilität und setzt wegen seiner lytischen Eigenschaften Histamin aus Mastzellen und Serotonin aus Thrombozyten frei (Wirth und Gloxhuber, 1981). Am isolierten Rattendiaphragma konnten Neumann et al. (1953) nachweisen, daß Mellitin die synaptische Transmission blockiert. Das Gift der Honigbiene enthält des weiteren Histamin, Dopamin, Noradrenalin, Hyaluronidase, Phospholipasen, Neurotoxine und mastzellendegranulierende Peptide (Wirth und Gloxhuber, 1981).

1.6. Pharmakologie von Echinacea

Viele pharmakologische und klinische Untersuchungen gaben Aufschluß über die Wirkungsmechanismen von Echinacea-Präparaten. Sie induzieren besonders die Steigerung der Abwehrreaktion gegen bakterielle aber auch virale Infektionen. Wo greift Echinacea im Abwehrgeschehen ein?

Einen Anhaltspunkt gibt der Einfluß von Echinacea-Inhaltsstoffen auf das Properdin-System wieder. Properdin ist ein Serumfaktor, der Komplementbestandteile benötigt um bakterizid wirken zu können. Er bindet bestimmte Virus- bzw. Bakterien-Polysaccharide, zu denen er hohe Affinität besitzt, und zerstört sie unter Einfluß von Komplement. Das Properdin-System ist als Prototyp der unspezifischen humoralen Infektabwehr anzusehen (Funke, 1983). Nach Injektionen (i.v.) mit Echinacea-Frischextrakt steigt der Properdinspiegel signifikant. Büsing und Thürigen (1958) stellten bei Untersuchungen an Kaninchen eine Erhöhung um 50 % - 70 % fest.

Diese Ergebnisse ließen sich aber beim Menschen nicht nachvollziehen (Reißmann, 1965).

Neben Untersuchungen über die unspezifisch resistenzsteigernden Eigenschaften von Echinacea gilt das Interesse besonders dem Einfluß von Echinacea-Inhaltsstoffen auf Virusinfektionen. An Zellkulturen wurde das antivirale Prinzip dieser Pflanzenpräparate erforscht:

Wacker und Hilbig (1978) wiesen nach, daß diese Phytopräparate in vitro nur dann antivirale Wirkung zeigen, wenn die Zellkulturen vor dem Viruskontakt mit Echinacea beschickt wurden. Sie schlossen daraus, daß Echinacea keine viruciden Eigenschaften hat, sondern daß sie die Viren am Eindringen in die gesunde Zelle hindert. Orinda et al. (1973) verglichen die Echinaceawirkungsweise mit der des Interferon.

Büsing (1952), Koch und Hase (1952) wiesen nach, daß Echinacea-Inhaltsstoffe in der Lage sind, Hyaluronidase zu hemmen. Dieses Enzym findet sich im Gewebe, wird aber auch von Viren und Bakterien produziert und in das von ihnen befallene Gewebe abgeschieden. Das Enzym spaltet Hyaluronsäure aus den

Polysaccharidstrukturen der Zelloberfläche ab. Durch diese Depolymerisierung der Hyaluronsäure wird die Zelloberfläche für Erreger durchlässig. Hyaluronsäure findet sich auch in der intrazellulären Kittsubstanz. Der Polymerisationsgrad der Hyaluronsäure des Gewebes ist maßgebend für die Viskosität der intrazellulären Kittsubstanz im mesenchymalen Gewebe (Funke, 1983). Je höher er liegt, desto größer ist der Widerstand gegen die Ausbreitung einer Infektion, da der Flüssigkeits- und Stoffaustausch zwischen den Zellen vermindert ist. Gewebseigene Hyaluronidase ist das regulierende Enzym. Erregerhyaluronidase setzt an gleicher Stelle an und senkt ebenfalls den Polymerisationsgrad der Hyaluronsäure und somit die Viskosität der intrazellulären Kittsubstanz, die Erreger können sich im Gewebe ausbreiten.

Koch und Haase (1952) wiesen mit ihrem modifizierten Spreadingtest eine inhibierende Wirkung von Echinacea-Frischpflanzenextrakt sowohl auf gewebseigene als auch bakterielle Hyaluronidase nach, wodurch der Polymerisationsgrad der Hyaluronsäure stabilisiert wird. Es werden also nicht die Erreger gehemmt, sondern die Zelle bzw. das Gewebe wird durch Echinacea so verändert, daß ein Eindringen in sie nicht mehr möglich ist. Hiermit wird zum Teil der therapeutische Effekt von Echinacea auf die Wundheilung erklärt. Histologische Untersuchungen ließen erkennen, daß Echinacin^R die Differenzierung von Fibroblasten zu Fibrozyten beschleunigt, letztere produzieren Hyaluronsäure (Orzechowski, 1963).

Ferner kommt es unter lokaler Einwirkung von Echinacin auf chronisch eitrige Wunden, ekzematöse und sekundär infizierte Hautkrankheiten zur beschleunigten Regeneration von Gewebszellen und somit zu einer Gewebsreaktion ähnlich der Proliferation (Meißner, 1980; Wacker et al., 1978).

Kuhn (1953), Koch und Uebel (1954), Möse (1983) und Wagner (1985) wiesen außerdem einen positiven Einfluß von Echinacea auf die Phagozytoseaktivität nach.

In der Humanmedizin wird mittels Echinacin^R (i.v.) der sogenannte Leukozyten-Provokationstest durchgeführt: Dabei kommt es 3 h nach Injektion zum Anstieg der Körpertemperatur

und zur signifikanten Erhöhung der Blut-Leukozytenzahl, vorausgesetzt, das Knochenmark ist nicht krankhaft verändert. Bei effektiver Strahlentherapie lässt sich so einerseits die Gesamtzahl der peripheren Blutleukozyten erhöhen und zugleich das Ausmaß der Schädigung und die Belastbarkeit des Knochenmarkes vor und nach der kurativen Strahlenexposition feststellen (Chone et al., 1969).

Welche Inhaltsstoffe von Echinacea diese Wirkung hervorrufen, ist im einzelnen nicht untersucht. Einen Anhaltspunkt findet man bei Bonadeo et al. (1971), die in Echinacea B eine Substanz erkannt haben, die mit zelloberflächenständiger Hyaluronsäure einen Komplex eingeht, der von Hyaluronidase nicht angegriffen wird.

Die Wirkungseigenschaften vorläufig noch nicht bestimmbarer Inhaltsstoffe von Echinacea lassen sich wie folgt zusammenfassen:

- 1.) Direkte Wirkung auf gewebeeigene bzw. von Erregern gebildete Hyaluronidase und damit Stabilisierung der in der Kittsubstanz enthaltenen Hyaluronsäure (Büsing, 1952; Koch und Haase, 1952).
- 2.) Aktivierung der Fibroblastendifferenzierung zu Fibrozyten, die ihrerseits Hyaluronsäure produzieren.
- 3.) Antivirale Eigenschaften.
- 4.) Mobilisierung der Knochenmarksreserven.
- 5.) Aktivierung histogener und hämatogener Phagozyten (Histiozyten und Leukozyten), die durch Phagozytose oder extrazellulären Abbau Erreger zerstören oder Zerfallsstoffe unschädlich machen.
- 6.) Aktivierung regenerativer Aufbauprozesse (z.B. funktionsfähigen Epidermiszellen aus dem Stratum germinativum. Echinacea-Präparationen haben also auch eine indirekt bakteriozide Wirkung, indem durch Aktivierung der Phagozytose die Erreger abgetötet und die Zerfallsprodukte abgebaut werden.

1.7. Mitogene

1.7.1. Allgemeines

Neben seiner Wirkung auf das Properdin-System, das Hyaluronsäure-Hyaluronidase-System, die Phagozytose und die Fibroblastendifferenzierung ist es möglich, daß Echinacea auch eine unspezifische Stimulierung der zellulären Abwehrmechanismen und die Sofortabwehr bewirkt, also ein Paramunitätsinducer ist. Paramunitätsinducer steigern die Proliferation immunkompetenter Zellen (Wagner, 1983), d.h. Lymphozyten werden zu Blastzellen transformiert (Sell, 1977). Diese Reaktion kann durch Antigene oder Mitogene bewirkt werden. Ist Echinacea ein Mitogen?

Definition des mitogenen Begriffs:

Mitogene Substanzen regen ruhende Lymphozyten zur DNA-Synthese mit anschließender Teilung oder Reifung, d.h. im Falle der B-Lymphozyten zur Immunglobulinsekretion, an. Dabei kommt es zu einem Gleichgewicht zwischen Proliferation und Reifung. Ein Lymphozyt muß zunächst proliferieren, um sich zur reifen Zelle zu entwickeln, die dann entsprechende Funktionen übernimmt. Plasmazellen beginnen mit der Antikörperproduktion, T-Zellen kooperieren als "Helferzellen" oder "Supressor-Zellen" oder lösen selbständig zellvermittelte Immunreaktionen aus, z.B. die zellvermittelte Lympholyse. Ist der Reifungsprozess abgeschlossen, kann keine weitere Proliferation stattfinden. Dieses Gleichgewicht wird in der Zellkultur durch Umweltfaktoren wie Zelldichte, Nahrungsangebot und zelluläre Produkte beeinflusst, wovon auch die mitogene Antwort der Zellen abhängt.

Mitogene stimulieren, im Gegensatz zu den Antigenen, mehrere Lymphozytenklone, sie sind damit polyklonale "Zellaktivatoren" (Coutinho et al., 1975). Möglicherweise sind sie nicht auf einen spezifischen Rezeptor angewiesen (Hirschhorn und Hirschhorn, 1974).

1.7.2. Einteilung der Mitogene

A) Immunologisch spezifische Mitogene

Diese Substanzen sind dadurch gekennzeichnet, daß sie lediglich auf Lymphozyten jener Organe wirken, die eine Immunantwort gegen sie zeigen, zumeist in Form einer Allergie vom Spättyp (Hirschhorn und Hirschhorn, 1974).

Zu ihnen werde gezählt: Antigene von Bakterien, Pilzen, Viren, Protein- und Nichtprotein-Antigene, allogene Zellen und Zellzerfallsprodukte.

B) Unspezifische Mitogene

Diese Mitogene bewirken "Lymphozytentransformation", ohne daß eine Sensibilisierung der Spenderzelle vorausgegangen ist. An erster Stelle stehen die Phytohämagglutinine (Lektine), zellagglutinierende, zuckerspezifische Proteine aus Pflanzen, besonders aus deren Samen. Lektine sind zumeist Glykoproteine, reich an Asparaginsäure, Serin, Threonin und arm an S-haltigen Aminosäuren. Das Molekulargewicht der Mitogene liegt zwischen 26000 (Weizenkeim-Agglutinin) und 269000 (Limabohnen-Lektin). Neben Lektinen werden zu den unspezifischen Mitogenen noch einige Bakterientoxine, (z.B. das nichtantigene Streptolysin S und das Staphylococcus-Toxin), Antilymphozytensera (ALS), Antigammaglobuline, Antigen-Antikörperkomplexe sowie einige Metallionen, cyclo-AMP, UV-Licht und Ultraschall gerechnet (Hirschhorn et al., 1970).

1.7.3. Wirkungsmechanismen der Mitogene

Mitogene wirken auf die Lymphozytenmembran. Die Rezeptoren für Lektine, Anti-Lymphozyten- und Anti-Immunglobulin-Antikörper sowie bakterielle Lipopolysaccharide liegen auf der Zelloberfläche, wobei sie sich vermutlich chemisch und topographisch von den für die Antigenerkennung zuständigen Strukturen unterscheiden. Zudem erscheinen Querverbindungen der Rezeptoren wichtig zu sein, da Fab-Monomere von ALS und Anti-Immunglobulinen wirkungslos sind. Werden diese Monomere

mit Hilfe von Anti-Fab-Antikörpern "überbrückt" bzw. mit Glutaraldehyd verknüpft, so binden sie sich an die Lymphozytenoberfläche, folglich ist die Bindung bi- bzw. polyvalent (Greaves et al., 1975). Die Anlagerung der Lektine hat eine Änderung der Rezeptorverteilung auf der Zelloberfläche zur Folge (Loor, 1974): das ursprünglich diffuse Rezeptormuster geht in eine fleckige (patchy) oder kappenähnliche (cap-like) Verteilung über. Dieser Umverteilung folgt nicht unbedingt eine Stimulation des Lymphozyten.

Neben den beschriebenen morphologischen Änderungen kommt es auch zu Stoffwechseländerungen. Die Zellmembran zeigt eine erhöhte Phosphatpermeabilität. Phosphatlipide werden vermehrt synthetisiert, die Konzentration der gesamten Phospholipidfraktion steigt. Auch wird Glucosamin vermehrt in Membranglycoproteine eingebaut (Hovi et al., 1978). Eingehende Untersuchungen wurden an den cyclischen Nucleotiden wegen ihrer Funktion als "second messengers" bei Einwirkung von Proteo- bzw. Peptidhormonen durchgeführt (Robinson et al., 1971). Smith et al. (1971) stellten fest, daß nach Mitogengabe die intrazelluläre cyclo-AMP-Konzentration sinkt, wohingegen die cyclo-GMP-Konzentration ansteigt (Hadden et al., 1972). Hirschhorn et al. (1970) wiesen nach, daß höhere Dosen cyclo-AMP die Lymphozytenstimulation hemmen, wobei T- und B-Lymphozyten in unterschiedlicher Weise betroffen sind (Vischer, 1976). Cyclo-GMP erhöht die mitogene Antwort und kann den Hemmeffekt von cyclo-AMP aufheben (Diamantstein und Ulmer, 1975). Möglicherweise gibt cyclo-GMP ein Signal für die Zellteilung, cyclo-AMP dagegen hemmt die Transformation, wobei scheinbar nur die T-Zellreifung beeinflußt wird. Bösing-Schneider und Haug (1967) beschrieben die Sekretion eines T-Zellfaktors, der die Funktion eines notwendigen zweiten Signals bei antigen-stimulierten B-Zellen hat.

Im Genaktivierungsprozess sind Azetylierung argininreicher Histone, Phosphorylierung der Kernproteine und ansteigende Akridinorange-Bindung der DNA eingeschlossen. Als Folge wird eine Zunahme der RNA-Synthese und eine Steigerung der Proteinsynthese beobachtet. Morphologisch unterscheiden sich

stimulierte Lymphozyten durch Vergrößerung, Basophilie und Pyroninophilie von den unstimulierten Zellen.

1.7.4. Pokeweed-Mitogen (PWM)

Als Vergleichssubstanz für die mitogene Wirkung von Echinacea bzw. Influnex^R wurde PWM gewählt. PWM ist ein Kermesbohnenextrakt, der als T- und B-Zell-Aktivator gilt, wie an Lymphozyten von Mensch (Geha, 1974), Rind (Muscoplatet al., 1974), Ziege (Van Dam et al., 1978), Maus (Shortman et al., 1973), Hund (Letwin und Quimby, 1985) und Huhn (Weber, 1973; Prügner, 1982) nachgewiesen wurde. PWM löst Transformation von B-Lymphozyten nur in Anwesenheit von T-Zellen aus, (Keightley et al., 1976; Fauci et al., 1976).

Askonase et al. (1974) und Janossy et al. (1977) konnten durch Zugabe von Kulturüberständen PWM-aktivierter T-Zellen isolierte, mit PWM versetzte B-Zellen stimulieren, was darauf schließen lässt, daß die B-Zell-Differenzierung von einem oder mehreren T-Zell-Faktoren abhängt. Keightley et al. (1976) stellten fest, daß sich periphere Blutlymphozyten in ihrer Reaktivität auf PWM in sogenannte "high" und "low" responders unterteilen lassen. Sie führten dies auf eine unterschiedlich große Fähigkeit der T-Zellfraktion zurück, die B-Zell-Aktivierung zu unterstützen. Loor (1974) beobachtete an mit Fluorchrom konjugiertem PWM, daß es sich nicht in nachweisbaren Mengen an B- und T-Lymphozyten bindet. Er schloß daraus, daß sich PWM nur an wenige T-Zellen oder Makrophagen bindet, die als Mediatoren für die Stimulation fungieren. Eine andere Erklärung hierfür ist, daß B-Zellen nur geringe, nicht nachweisbare PWM-Mengen zur Stimulation benötigen. Fünf Proteinfractionen konnten von Waxdal und Basham (1974) aus PWM isoliert werden. Dabei fiel die unterschiedliche mitogene Zellspezifität dieser Proteine auf, die direkt von ihren physiko-chemischen Eigenschaften abzuhängen scheint.

2. Fragestellung

Im Rahmen dieser Arbeit soll *Echinacea angustifolia*, sowohl als Monopräparat als auch als Bestandteil eines Mischpräparates auf seine mitogenen Eigenschaften untersucht werden.

Dazu wurden Hühner- Lymphozyten *in vitro* mit unterschiedlichen Konzentrationen der Testpräparate versetzt. Die Präparate wurden sowohl als alkoholische als auch als wässrige Lösungen eingesetzt, um den Einfluß der Darreichungsform auf das Zellwachstum und die Mitoserate zu untersuchen.

Die mitogene Stimulation wurde anhand der Aufnahme von ^3H -Thymidin in die DNA der Lymphozyten bestimmt.

2. Material und Methoden

2.1. Tiermaterial

Nicht typisierte, immunologisch intakte, erwachsene Leghorn (Heisdorf-Nelson-Lohmann=HNL) Hühner beiderlei Geschlechts. Die Haltung erfolgte in Gruppen zu vier Tieren auf Gitterrosten. Handelsübliches Legehennenfutter (Altromin) und Wasser standen ad libitum zur Verfügung.

2.2. Substanzen und Geräte

2.2.1. Medien und Zusätze

Liquemin, Hoffmann La Roche AG, Schweiz

RPMJ 1640 ohne Glutamin mit NaHCO_3 , Seromed GmbH

L- Glutamin, Seromed GmbH

Ficoll- Paque, Pharmacia Fine Chemicals Penicillin und Streptomycin, Seromed GmbH

gepooltes Hühnerserum, Merck Schuchard.

Stimulantien: Mitogene: Pokeweed-Mitogen (PWM)00, Gibco BCK
Biocult Chemie

Influe^Rx Injektabile, Steigerwald

Influe^Rx Tropfen, nach Alkoholentzug, Steigerwald

Echinacea angust. Extrakt, Steigerwald

Echinacea angust.Extrakt ohneAlkohol, Steigerwald

³ H-Thymidin, spez. Aktivität 16,2 $\mu\text{Ci}/\text{mM}$, New England
Nuclear

2.3. Präparationsmaterial

Gewebekulturflaschen 301 F, Falcon Plastics Interchem

Mikrotitrationsplatten, Intermed, München

Einmalröhrchen, Falcon Einmalpipetten, serologisch, Falcon

Eppendorfspitzen

Sterilfilter, 20 μ m, Sartorius

Szintillationsröhrchen, Zinsser

Quickszint 212, Zinsser Glasfiberfilterpapier, Flow Laboratories

2.4. Geräte

Titertek Cell Harvester. Flow Laboratories

Packard Szintillationszähler

2.5. Stimulation von Lymphocyten

2.5.1. Lymphocytengewinnung

2.5.1.1. Blutentnahme

Mittels einer mit 0,5 ml verdünntem Liquemin (250 IU Na-Heparinat) gefüllten sterilen Einmalspritze werden 5 ml Blut aus der V. jugularis entnommen und 1:2 mit RPMI 1640 verdünnt.

2.5.1.2. Ficoll-Gradient

10 ml Ficoll-Paque (Fa. Pharmacia, Freiburg) werden mit der gleichen Menge verdünnten Blutes in Zentrifugenröhrchen überschichtet und bei 18° C und 400 x g 20 min zentrifugiert. Anschließend wird die sich zwischen Ficoll-Paque und dem darüber stehenden Plasma befindende Lymphocytenschicht vorsichtig mit einer Pasteurpipette abgehoben.

2.5.1.3. Waschen

Die über Ficoll-Paque isolierten Lymphocyten werden in Zentrifugenröhrchen überführt und mit RPMI 1640, dem 1 % Glutamin und 2 % Hühnerserum zugesetzt wurden, auf 10 ml

aufgefüllt und 10 min bei 18°C und 400 xg zentrifugiert. Der Überstand wird abgegossen und dieser Waschvorgang zweimal wiederholt.

2.5.1.4. Zählung der lebenden Lymphocyten

25 μl Zellsuspension werden mit 25 μl Trypanblau vermischt. Die Auszählung der lebenden Lymphocyten erfolgt in der Neubauer-Kammer.

2.5.1.5. Auffüllen der Kulturflaschen

Als Kulturflaschen dienen Falcon Gewebekulturflaschen, welche mit $2,5 \times 10^7$ Zellen/ 10 ml beschickt werden. Das Medium besteht aus RPMI-1640, 1% Glutamin und 2% gepooltem inaktiviertem Hühnerserum sowie 100 IU Penicillin und 100 μg Streptomycin pro ml. Es werden die entsprechenden Konzentrationen an Echinacea bzw. Influenza sowie PWM als Standard zugesetzt. Eine nicht-stimulierte Kontrollprobe wird jeweils mitgeführt.

2.5.1.6. Kultivierung

Die Kultivierung im Brutschrank bei 39°C , 90 % Feuchtigkeit und 5% CO_2 dauert 3 bis maximal 6 Tage. Am Tag 3 werden 3 ml Überstand aus den Flaschen vorsichtig abpipetiert und durch 3 ml frisch angesetzten Mediums (s.o.) ersetzt.

Am dritten bzw. sechsten Tag wird die Zellsuspension in den Kulturflaschen resuspendiert und in Zentrifugenröhrchen überführt, dann bei 18°C und 400 xg 10 min. zentrifugiert. Nach Abschütten des Überstandes füllt man mit 1 ml Medium auf und resuspendiert erneut. Nach dem Zählen der lebenden Lymphocyten (siehe 3.5.1.4.) wird die Zellsuspension auf 1×10^6 Zellen pro ml eingestellt.

100 μl Suspension werden mittels Eppendorfpipetten in die

Löcher der Mikrotitrationsplatte gegeben und zwar je drei Parallelansätze und mit 100 μ l Medium aufgefüllt.

2.5.1.7. Markierung

Pro Vertiefung werden 1,0 μ l ^3H -Tdr zugesetzt. Die Mikrotitrationsplatten werden für 16-18 Std. im Brutschrank inkubiert.

2.5.1.8. Ernte

Mit dem Titertek- Cell- Harvester werden die Zellen aus den Mikrofiltrationsplatten mit aqua dest. über Glasfiterfilterpapier abgezogen. Die Filterpapierplättchen werden 30 min im Trockenschrank getrocknet, in Kunststoffzellfläschchen gegeben, die mit 10 ml Szintilationsflüssigkeit (Quickszint) aufgefüllt und kurz geschüttelt werden. Im Packard Szintilationszähler wird der radioaktive Einbau gemessen.

2.5.2. Auswertung der mitogenen Stimulation

Die Aufnahme von ^3H -Thymidin in die DNS der Lymphocyten während einer 16 bis 18 stündigen Markierungszeit dient als Parameter für die Mitoseaktivität.

Berechnet wird der Stimulationsindex (Si):

$$\text{Si} = \frac{x1 \text{ (cpm/Kultur)}}{x2 \text{ (cpm/Kultur)}}$$

x1 = Mittelwert der äquivalenten Mikrokulturen bei bestimmter Mitogenkonzentration

x2 = Mittelwert der äquivalenten Mikrokulturen ohne Mitogenzusatz

2.6. Testpräparate

2.6.1. Influtex^R injektabile, Steigerwald

Zusammensetzung (nach Vademecum, Steigerwald):

1 Ampulle zu 2 ml enthält:

Echinacea angust.	D 1	400,0 mg/ 2ml
Eupatorium perfol.	D 3	200,0 mg/ 2ml
Gelsemium	D 3	200,0 mg/ 2ml
Lachesis	D 10	300,0 mg/ 2ml
Vitamin C		40,0 mg/ 2ml

2.6.2. Influtex Tropfen nach Alkoholentzug

Zusammensetzung wie Influtex (nach Vademecum, Steigerwald):

100 ml enthalten:

Aconitum	D 4	15,0 ml/ 100 ml
Apis mell.	D 3	10,0 ml/ 100 ml
Echinacea angust.	8	30,0 ml/ 100 ml
Lachesis	D 6	30,0 ml/ 100 ml

Die getesteten Konzentrationen der Präparate betragen:

50, 100, 200, 500, 1000 µl pro 10 ml Kulturmedium.

2.6.3. Echinacea-Extrakte

Es wurden untersucht:

- Echinacea in alkoholischer Lösung (Urtinktur; in 35 % iger Alkohollösung), steril filtriert. Echinacosidgehalt 25 µg/ml.
- Echinacea in wässriger Lösung (Echinacea angust. rad. sicc), steril filtriert. Echinacosidgehalt 50 mg/g Lyophilisat.

Die Konzentration von PWM betrug:

100 µl der Originalkonzentration (Fa. Gibco) (1: 10 verdünnt)
pro 10 ml Kulturmedium

Die Konzentration von Alkohol (35 %) betrug: 100 µl/ 10 ml

Kulturmedium.

3. Ergebnisse

3.1. Echinacea in wässriger Lösung

An Tag 3 zeigt Echinacea (in wässriger Lösung) in den getesteten Konzentrationen (50, 100, 200 μ l/10 ml Kulturmedium) ebenso wie PWM (100 μ l/10 ml Kulturmedium) geringe Stimulation (Fig. 1; Tab. 1).

Es ergab sich keine eindeutige Abhängigkeit der Proliferationsrate von der Echinacea-Konzentration (Tab. 1).

An Tag 6 zeigen Lymphozyten von Kontrollhühnern in Kombination mit PWM (100 μ l/10 ml) höhere Stimulations-Indices als Kulturen, die mit Echinacea (50, 100, 150, 200 μ l/10 ml) inkubiert wurden (Fig. 2; Tab 2). Der Unterschied war bei 100 μ l/ 10 ml Echinacea im Vergleich zu PWM signifikant (Tab. 2).

Am Tag 6 zeigten die Proliferationsraten eine deutlichere Abhängigkeit von der verwendeten Echinaceakonzentration als an Tag 3. 50 μ l/10 ml Echinacealösung erwies sich am wirksamsten.

Somit induziert Echinacea in wässriger Lösung in Lymphozyten von Kontrollhühnern eine geringe Proliferation, die an Tag 3 höher liegt als an Tag 6. Im Gegensatz dazu zeigt PWM an Tag 6 höhere Stimulationswerte.

Die Überprüfung der Anzahl lebender Lymphozyten nach 3- bzw. 6-tägiger Kultivierung mit den verschiedenen Additiven zeigte in allen Ansätzen eine Verminderung der Zellzahl von Tag 3 bis 6 (Fig.1; Fig.2; Tab. 3; Tab. 4).

An Tag 3 zeigte sich kein Unterschied in der Überlebensrate zwischen den einzelnen Ansätzen (Fig. 1; Tab. 3).

An Tag 6 wiesen Kulturansätze mit 150 oder 200 μ l Echinacea/10 ml niedrigste Lymphozytenzahl auf, jedoch war der Unterschied zu den anderen Kombinationen nicht signifikant (Fig. 2; Tab. 4).

3.2. Echinacea in alkoholischer Lösung

In den getesteten Konzentrationen (50, 100, 200 μ l/10 ml Kulturmedium) zeigte Echinacea (in alkoholischer Lösung) an Tag 3 keine Abhängigkeit der Stimulation von der eingesetzten Dosis (Fig. 3; Tab. 5). Die Proliferationsraten zeigten keinen signifikanten Unterschied zu den mit PWM (100 μ l/10 ml) oder mit Alkohol (35 %; 100 μ l/10 ml) erzielten Werten.

Die an Tag 6 ermittelten Stimulationswerte ergaben ein ähnliches Bild (Fig. 4; Tab. 6). Auch hier zeigte sich kein signifikanter Unterschied zwischen den getesteten Echinacea-Konzentrationen, PWM und Alkohol.

Die Zugabe von Echinacea in alkoholischer Lösung oder Alkohol alleine ergab keine unterschiedliche Stimulation an Tag 3 oder 6, während die Werte mit PWM an Tag 6 leicht erhöht waren.

Tabelle 7 und Tabelle 8 zeigen die Anzahl der Überlebenden Zellen nach Kultivierung mit Echinacea, Alkohol, PWM oder ohne mitogene Zusätze (0-Wert). An Tag 3 und Tag 6 lagen die Werte mit 200 μ l Echinacea signifikant höher als die Zellausbeute bei den anderen Echinacea-Konzentrationen.

3.3.: Influe^x R in wässriger Lösung

Untersuchungen mit dem Mischpräparat Influe^x R (in wässriger Lösung) ergaben mit Lymphozyten von Kontrollhühnern an Tag 3 konzentrationsabhängige Stimulationswerte (Fig. 5; Tab. 9). Zugabe von 50 μ l Influe^x R zum Kulturansatz ergab einen mittleren Stimulations-Index-Wert von 3.41, bei Erhöhung der Influe^x R-Konzentration auf 200 μ l fiel der Stimulations-Index-Wert auf 1.95 ab. Dieser Abfall war jedoch nicht signifikant.

An Tag 6 zeigen die Proliferationswerte einen nichtsig-

nififikanten Anstieg der Stimulations-Index-Werte von 2.42 auf 4.19 bei Erhöhung der Influe^R-Konzentration von 50 auf 200 µl (Fig. 6; Tab. 10). Auf Grund der hohen Standardabweichungen konnte zwischen Tag 3 und 6 kein Unterschied im Proliferationsverhalten von Lymphozyten bei Zugabe von Influe^R erfasst werden.

Im Vergleich zu den mit PWM (100 µl/ 10 ml) erzielten Stimulationswertenerwies sich Influe^R in wässriger Lösung als ähnlich wirksam (Fig. 5; Fig. 6; Tab. 9; Tab. 10). Bezüglich der Anzahl überlebender Zellen an Tag 3 zeigte sich kein Unterschied in den verschiedenen Kulturansätzen (Tab. 11). Die an Tag 6 ermittelten Werte ergaben signifikant mehr intakte Lymphozyten bei Zugabe von 100 µl PWM/10 ml Kulturmedium (Tab. 12) als bei Inkubation mit Influe^R.

3.4.: Influe^R injectabile

Sowohl an Tag 3 als auch an Tag 6 zeigte Influe^R injectabile in den getesteten Konzentrationen (50, 100, 200, 500, 1000 µl/10 ml) keine stimulierende Wirkung auf Lymphozyten von Kontrollhühnern, während die Zugabe von PWM (100 µl/10 ml) Proliferation induziert. (Fig. 7; Fig. 8; Tab. 13; Tab. 14).

Die in Tabelle 13 ermittelten Zellzahlen an Tag 3 ergaben verminderte überlebende Lymphozyten in Kulturen mit Influe^R injectabile. Nach 6 Tagen Kultivierungsdauer zeigten einige Influe^R-Konzentrationen (100, 200 µl/10 ml) eine signifikant geringere Zellausbeute im Vergleich zu PWM. Somit verschlechtert Influe^R injectabile die Kulturbedingung für aviäre Lymphozyten.

Die signifikanten Unterschiede der Zellzahl-Mittelwerte an Tag 6 lassen sich wegen der breiten Streuung der Werte nicht feststellen.

FIG. 1

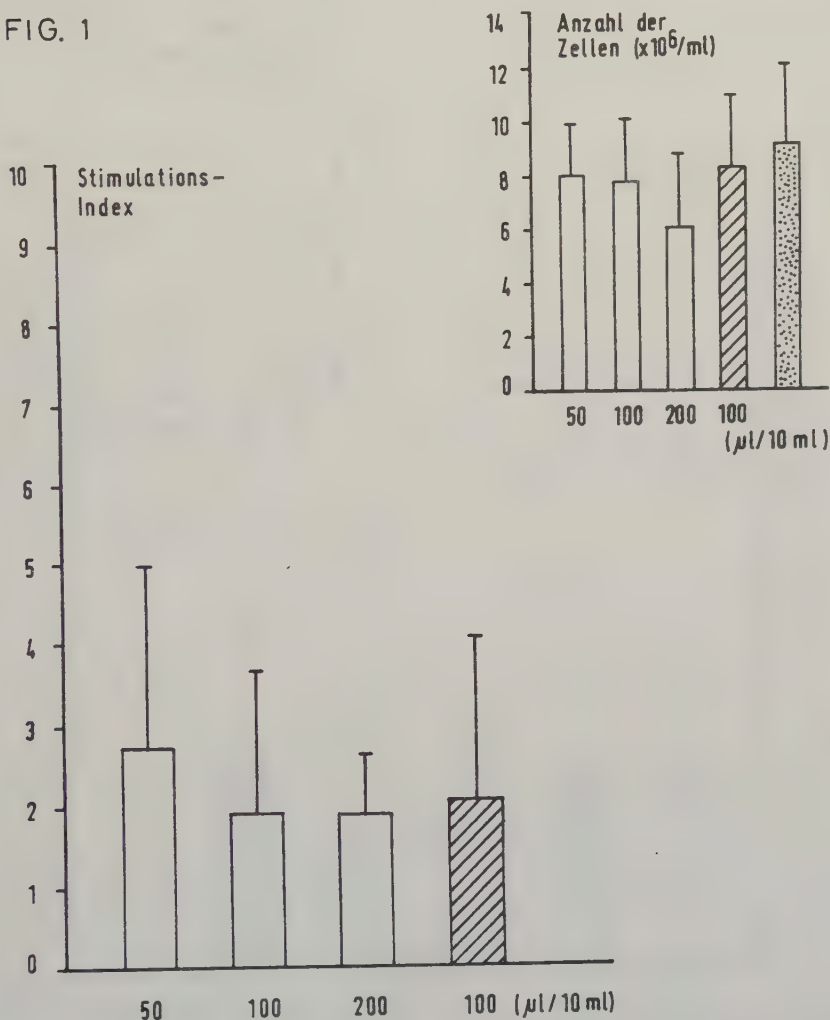


Fig.1: Stimulations-Indices unter Einfluß verschiedener Konzentrationen von Echinacea in wässriger Lösung (= ) sowie PWM (= ) nach 3-tägiger mitogener Stimulation.

Einschub: Mittelwerte der Anzahl ($\times 10^6/\text{ml}$) der lebenden Zellen nach Zugabe verschiedener Konzentrationen von Echinacea in wässriger Lösung sowie PWM am Tag 3.

Nullwert (= ) : Keine Zugabe von Mitogen vorangegangen.

FIG. 2

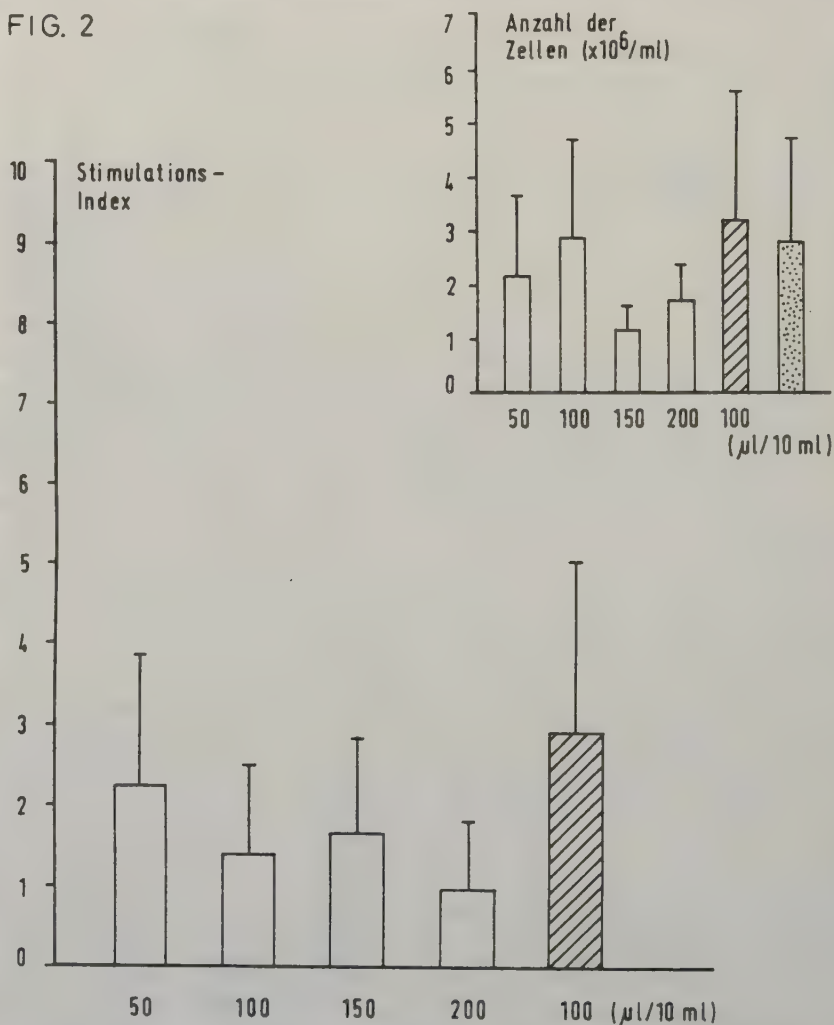


Fig.2: Stimations-Indices unter Einfluß verschiedener Konzentrationen von Echinacea in wässriger Lösung (= ) sowie PWM (= ) nach 6-tägiger mitogener Stimulation.

Einschub: Mittelwerte der Anzahl ($\times 10^6/\text{ml}$) der lebenden Zellen nach Zugabe verschiedener Konzentrationen von Echinacea in wässriger Lösung sowie PWM am Tag 6.

Nullwert (= ) : Keine Zugabe von Mitogen vorangegangen.

FIG. 3

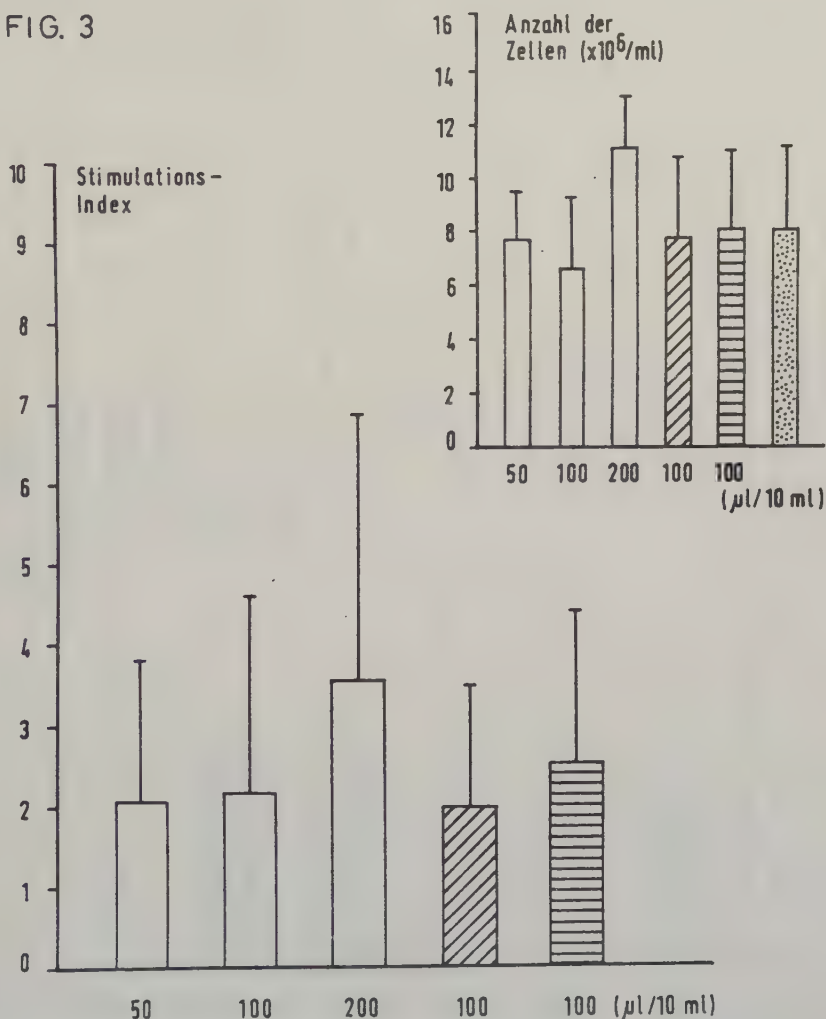


Fig.3: Stimations-Indices unter Einfluß verschiedener Konzentrationen von Echinacea in alkoholischer Lösung (= ) sowie PWM (= ) und 35%-igem Alkohol (= ) nach 3-tägiger mitogener Stimulation. Einschub: Mittelwerte der Anzahl ($10^6/\text{ml}$) der lebenden Zellen nach Zugabe verschiedener Konzentrationen von Echinacea in alkoholischer Lösung sowie PWM und 35%-igem Alkohol am Tag 3. Nullwert (= ) : Keine Zugabe von Mitogen vorangegangen.

FIG. 4

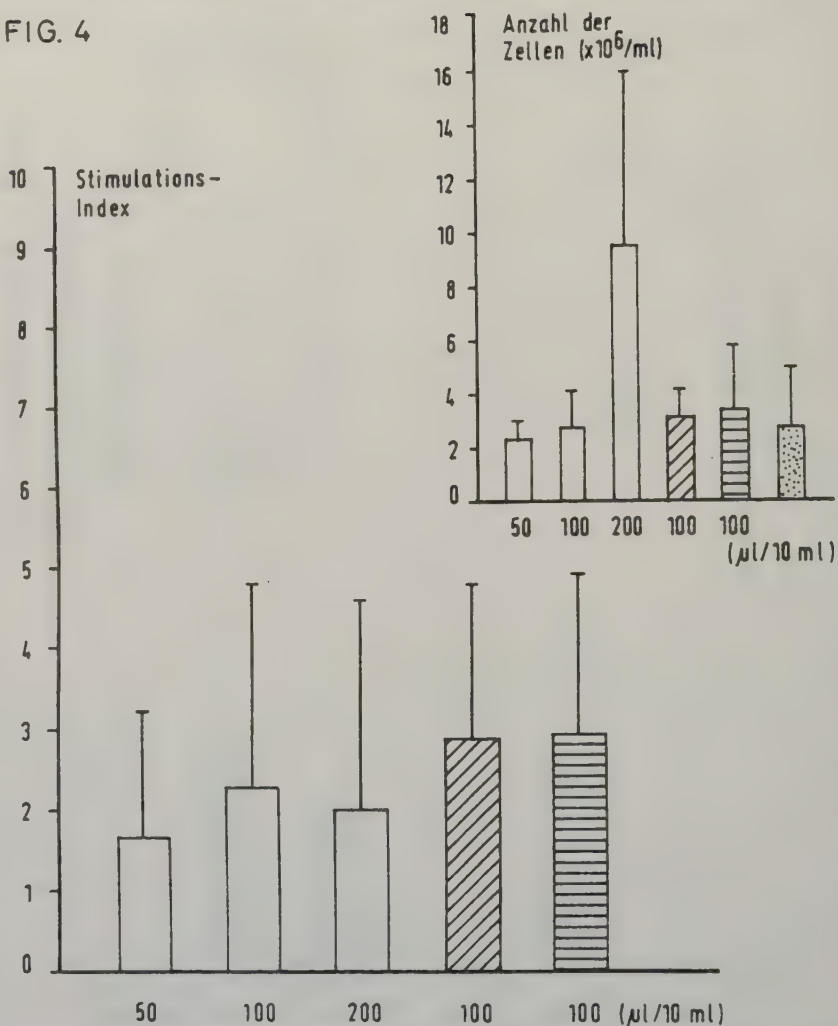


Fig.4: Stimations-Indices unter Einfluß verschiedener Konzentrationen von Echinacea in alkoholischer Lösung (= ) sowie PWM (= ) und 35%-igem Alkohol (= ) nach 6-tägiger mitogener Stimulation. Einschub: Mittelwerte der Anzahl ($\times 10^6/\text{ml}$) der lebenden Zellen nach Zugabe verschiedener Konzentrationen von Echinacea in alkoholischer Lösung sowie PWM und 35%-igem Alkohol am Tag 6. Nullwert (= ): Keine Zugabe von Mitogen vorangegangen.

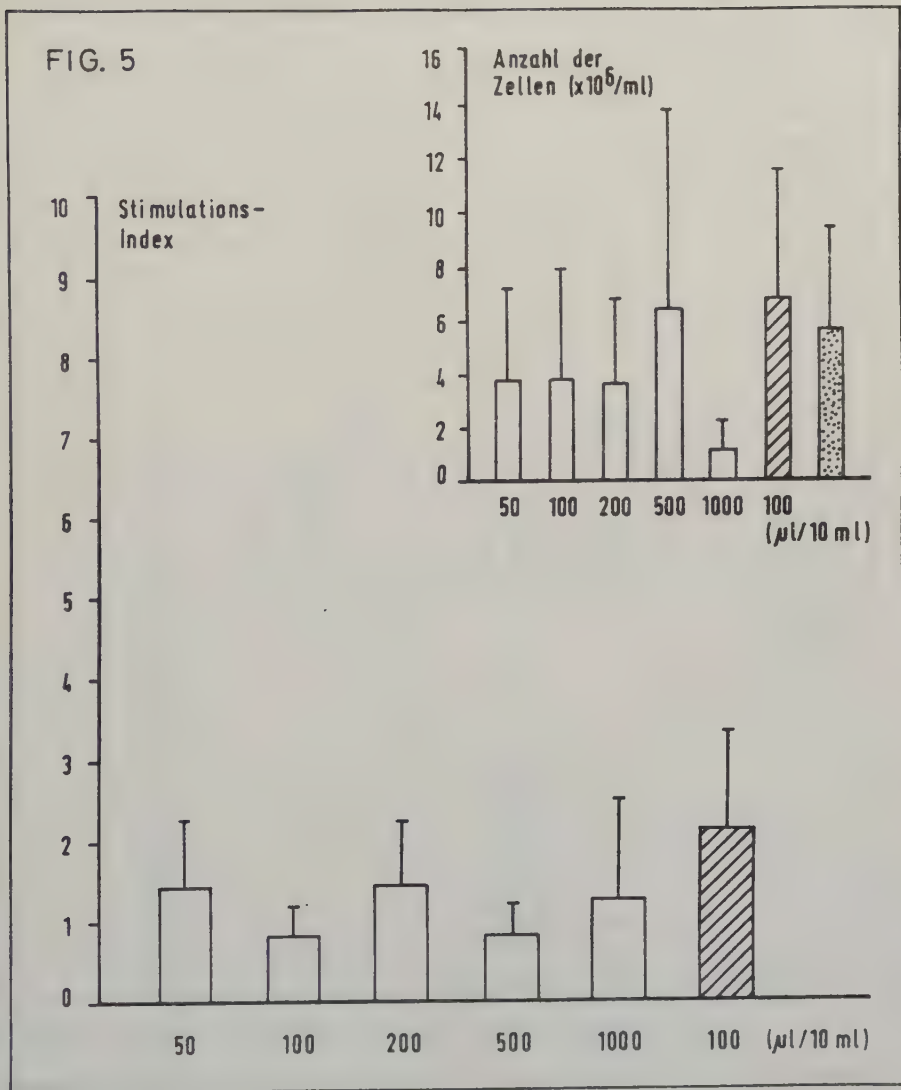


Fig.5: Stimations-Indices unter Einfluß verschiedener Konzentrationen von Influerx^R injectabile (= ) sowie PWM (= ) nach 3-tägiger mitogener Stimulation.

Einschub: Mittelwerte der Anzahl ($\times 10^6/\text{ml}$) der lebenden Zellen nach Zugabe verschiedener Konzentrationen von Influerx^R injectabile sowie PWM am Tag 3.

Nullwert (= ) : Keine Zugabe von Mitogen vorangegangen.

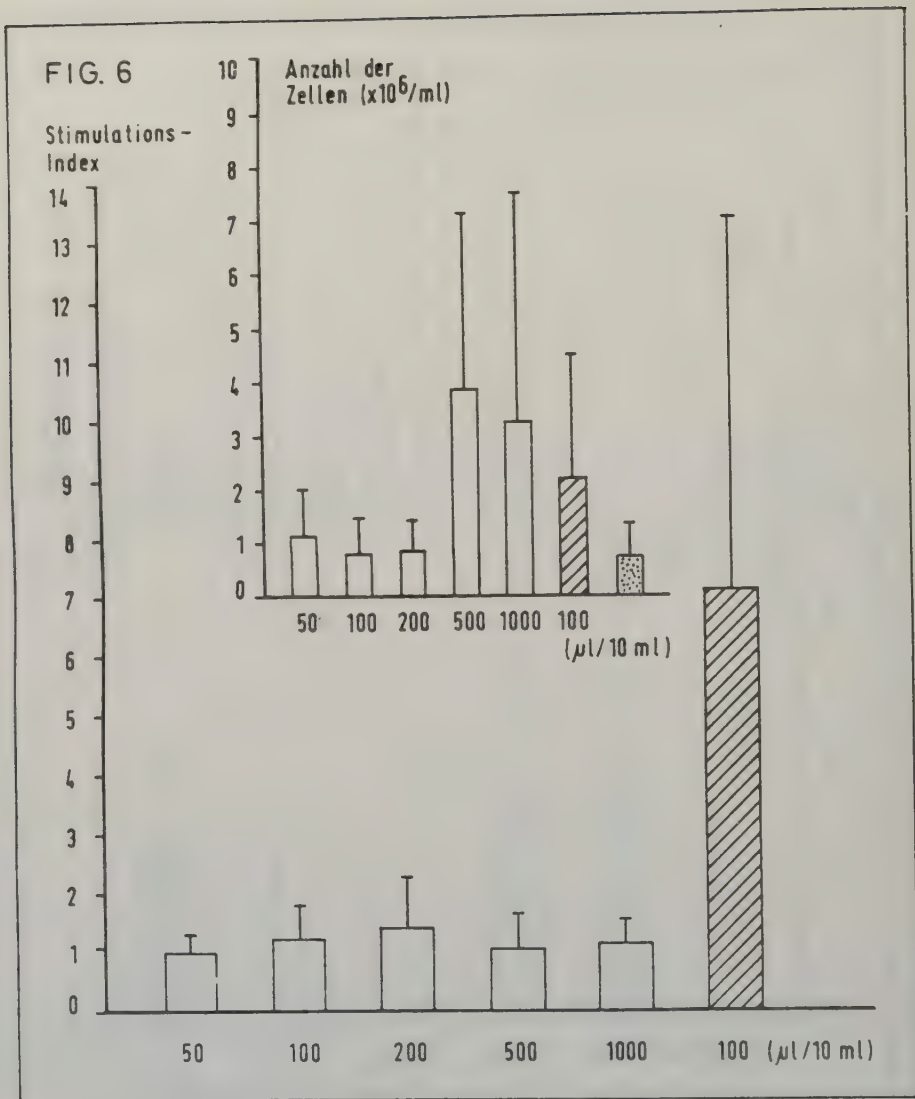


Fig. 6: Stimulations-Indices unter Einfluß verschiedener Konzentrationen von InflueX^R injectabile (= ) sowie PWM (= ) nach 6-tägiger mitogener Stimulation.

Einschub: Mittelwerte der Anzahl ($10^6/\text{ml}$) der lebenden Zellen nach Zugabe verschiedener Konzentrationen von InflueX^R injectabile sowie PWM am Tag 6.

Nullwert (= ) : Keine Zugabe von Mitogen vorangegangen.

FIG. 7

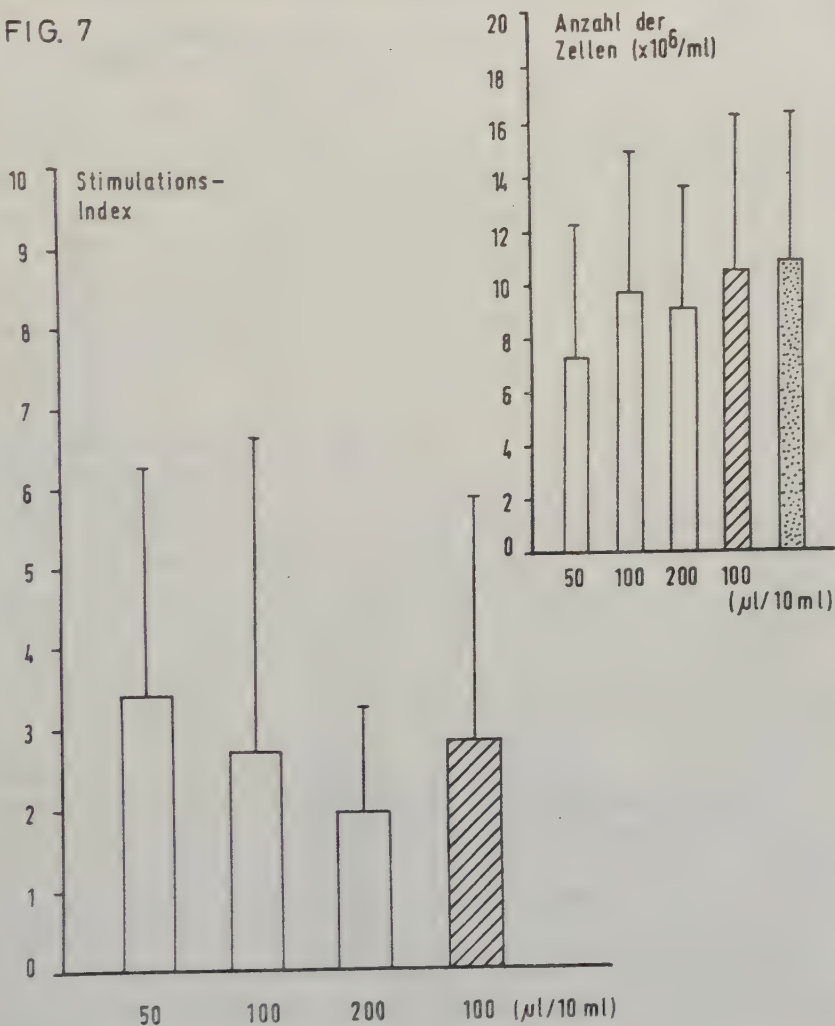


Fig.7: Stimations-Indices unter Einfluß verschiedener Konzentrationen von InflueX^R in wässriger Lösung (= ) sowie PWM (= ) nach 3-tägiger mitogener Stimulation.

Einschub: Mittelwerte der Anzahl ($\times 10/\text{ml}$) der lebenden Zellen nach Zugabe verschiedener Konzentrationen von InflueX^R in wässriger Lösung sowie PWM am Tag 3.

Nullwert (= ) : Keine Zugabe von Mitogen vorangegangen.

FIG. 8

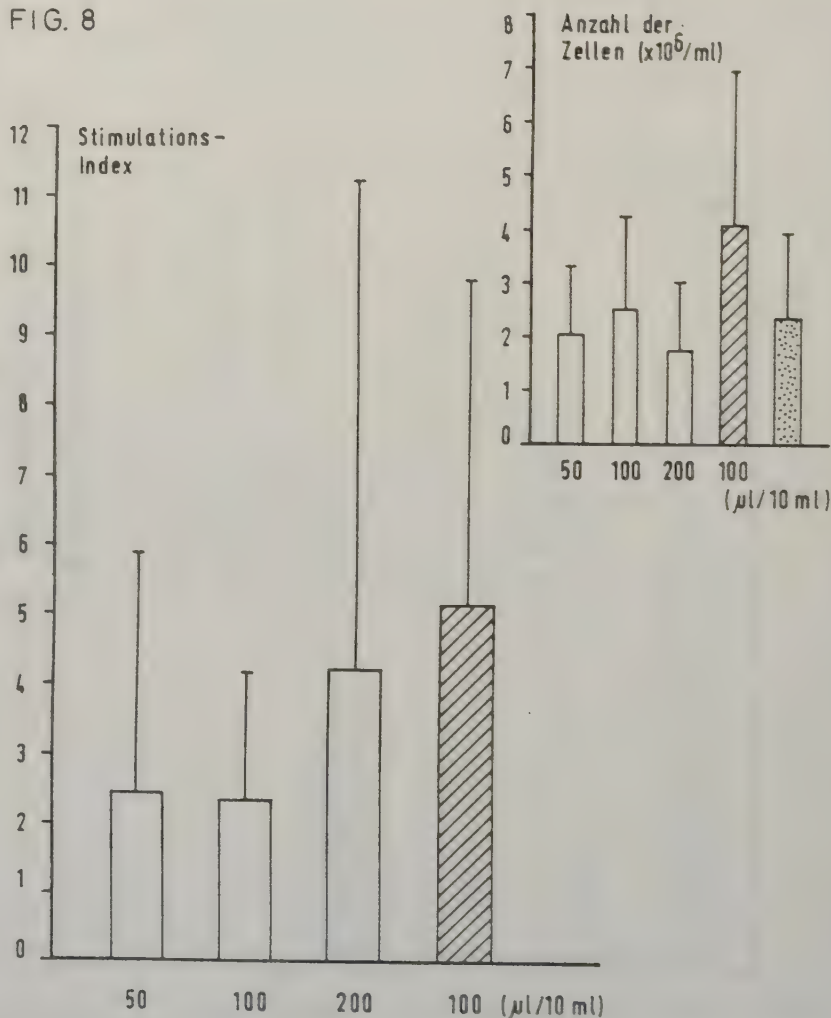


Fig.8: Stimulations-Indices unter Einfluß verschiedener Konzentrationen von Influenza^R in wässriger Lösung (= ) sowie PWM (= ) nach 6-tägiger mitogener Stimulation.

Einschub: Mittelwerte der Anzahl ($\times 10^6/\text{ml}$) der lebenden Zellen nach Zugabe verschiedener Konzentrationen von Influenza^R in wässriger Lösung sowie PWM am Tag 6.

Nullwert (= ) : Keine Zugabe von Mitogen vorangegangen.

4. Diskussion

Nachdem am hiesigen Institut Untersuchungen hinsichtlich der phagozytosesteigernden Wirkung (Klumpp, 1986; Reifenberg, Diss. in Vorbereitung). sowie der Beeinflussung der humoralen Immunreaktion in vivo (Würdinger, 1986) durch Echinacea bzw. Influe^x^R durchgeführt wurden, sollten in der vorliegenden Arbeit die mitogene Wirkung dieser Präparate auf Hühnerlymphozyten anhand des Lymphozyten-Transformationstests ermittelt werden.

4.1. Zellgewinnung und Kultivierung

Die Lymphozytenisolierung wurde nach Böyum (1968), modifiziert nach Böhringer (1986) über Ficoll-Paque durchgeführt. Es handelt sich dabei um eine Auftrennung über einen Dichtegradienten, bei der die Lymphozyten quantitativ erfaßt werden (Otto und Schmid, 1970). Die Zellausbeute und die Stimulationswerte mit Mitogenen (Prügner, 1982) sind mit denen vergleichbar, die andere Autoren bei aviären Lymphozyten nach Anwendung der Langzeitzentrifugation fanden (Kirchner und Oppenheim, 1972; Hovi et al., 1978; Benedict et al., 1980). Wichtig erscheint sorgfältiges dreimaliges Waschen mit Medium, um alle Ficollreste, die stimulationshemmend wirken können, zu entfernen.

Für die Kultivierungsdauer wurde eine Zellzahl von 2.5×10^7 pro 10 ml gewählt, um einerseits die für die Zellinteraktionen notwendige Zelldichte zu erreichen (Moorhead et al., 1967; Leventhal et al., 1969; Schellekens und Eijsvogel, 1968) und andererseits nicht durch zu hohe Zellkonzentration Zelltod und frühes Nachlassen der Proliferationsaktivität zu induzieren (Bernheim et al., 1978).

Um eine weitere Beeinflussung der mitogenen Antwort durch Zellabbauprodukte und mangelhaftes Nahrungsangebot weitgehend auszuschließen, wurden die 6-Tage-Kulturen an Tag 3 durch teilweisen Austausch von Medium gefüttert.

Die mitogene Stimulation der peripheren Blutlymphozyten von

Hühnern nach Inkubation mit PWM oder Echinacea bzw. Influe^x^R wurde sowohl nach drei als auch nach sechs Kulturtagen ermittelt. Vorversuche nach ein- bzw. zweitägiger Kultivierung (nicht beschrieben) ergaben in allen Kombinationen mit Zusatzstoffen Stimulationswerte von circa 0.7 bis 1.2. Da die Wirkungskinetik der mitogenen Stimulation von Echinacea angustifolia und Influe^x^R unbekannt ist, wurde in dem für PWM beschriebenen Wirkungsintervall - für Stimulation drei bis vier Tage (Weber, 1973; Vainio und Ratcliffe 1984) und für die Immunglobulin-Produktion sechs bis sieben Tage (Chan et al., 1980) getestet.

Als Maß für die Proliferation wurde der ³H-Thymidin-Einbau gemessen. Die Beziehung zwischen ³H-Thymidin-Aufnahme in die Zelle und der DNA-Syntheserate ist außerordentlich komplex (Bernheim, 1978). Es ist bekannt, daß ³H-Thymidin während der Interphase der Mitose in die DNA eingebaut wird (Hare, 1963) und somit eine Quantifizierung der Zellproliferation erlaubt. Lohrmann et al. (1974) stellten fest, daß der vermehrte ³H-Thymidin-Einbau nicht durch einen schnelleren Ablauf der Zellzyklen hervorgerufen wird, sondern seine Ursache in einer grösseren Anzahl stimulierter Zellen hat. Entnimmt man einer sechstägig mitogenstimulierten Kultur ein Aliquot, so entspricht es dem Verhältnis proliferierender/nichtproliferierender Zellen in der Kultur. Die verwendete Thymidin-Konzentration wurde bei mit PWM stimulierten Hühnerlymphozyten in der Dichte 1×10^6 pro Mikrowell bei einer Inkubationsdauer von sechs Stunden als optimal beschrieben (Vainio und Ratcliffe, 1984).

4.2. Diskussion der Ergebnisse

4.2.1. Versuchsbewertung

4.2.1.1. Dosierung der immunstimulierenden Substanzen

Die von den Herstellern angegebenen Dosisempfehlungen für immunstimulierende Präparate sind zumeist nicht experimentell belegt. Erschwerend kommt hinzu, daß die Wirkung von Immunstimulantien dualistisch sein kann und - abhängig vom Zeitpunkt der Applikation, der verabreichten Dosis sowie von der individuellen Immunsituation - sowohl fördernd als auch hemmend sein kann (Wagner, 1986).

Aufgrund von Vorversuchen wurden für *Echinacea angustifolia*, in wässriger oder alkoholischer Lösung und Influe^x_R Konzentrationen zwischen 50 und 200 µl/10 ml gewählt. Influe^x_R injectabile wurde in einer Dosisbreite von 50 bis 1000 µl/10 ml getestet.

4.2.1.2. Verwendung von Mischpräparaten

Pflanzliche Arzneimittel zur Steigerung der körpereigenen Abwehrkräfte gibt es von verschiedenen Herstellern. Alle Präparationen sind - mit wenigen Ausnahmen - Kombinationspräparate, in denen *Echinacea*-Extrakt nur ein Bestandteil neben anderen Pflanzenextrakten, tierischen Giften und auch Mineralien und Vitamin C ist. Untersuchungsergebnisse aus der Behandlung mit Mischpräparaten können denen, die mit Monopräparaten erzielt wurden nicht gleichgesetzt werden.

Bisher wurde noch nicht geprüft ob beim Mischen mit verschiedenen Extrakten das wirksame Prinzip der *Echinacea* verloren geht (Hänsel, 1985). Beim Vergleich einander ähnlicher, in der Rezeptur variierender Mischpräparate müssen selbstverständlich antagonistische oder synergistische Interaktionen

mit in Betracht gezogen werden.

Eine Beurteilung der den Effekt erzielenden Wirkstoffe ist erst möglich, wenn Untersuchungen über jeden einzelnen Extrakt und jede dieser Kombinationen durchgeführt worden sind um die verschiedenen Effekte, wie den homergischen (zwei oder mehr Arzneistoffe haben den gleichen pharmakologischen Effekt), den heterogistischen (nur ein Arzneistoff der Kombination führt zum Effekt, Einzeleffekt) bzw. Synergismus (der Effekt der Kombination ist grösser als die Summe der Wirkung der Einzelkomponenten) klassifizieren zu können (Ritschel, 1973). Fällt ein Bestandteil weg, kann die Wirkung stark abgeschwächt werden, auch wenn dieser Bestandteil für sich nur gering wirksam ist (Wagner, 1986).

4.2.1.3. Streuung der Werte

Bei Betrachtung der Ergebnisse fällt die breite Streuung der Einzelwerte auf (siehe tabellarischer Anhang). Derartige individuelle Unterschiede in der Beantwortung mitogener Reize werden häufig beschrieben.

Larsen (1979) stellte bei in vitro Versuchen an mitogen stimulierten (PWM, PHA, LPS) Schaflimphozyten beträchtliche Schwankungen der Stimulations-Indices der einzelnen Tiere fest. Wiederholte Versuche über einen Zeitraum von 4 Monaten ergaben eine große individuelle Variationsbreite der Immunantwort.

Angus und Yang (1978) berichten, daß bei mitogener Stimulation von Hundelymphozyten in vitro individuelle Schwankungen täglich oder sogar alle 4 Stunden zu beobachten waren. Sie schlossen daraus, daß solche zeitabhängigen Unterschiede die Norm sind. Entsprechende Versuche an Menschen- (Kaplan et al., 1976) und Katzenlymphozyten (Cockerell et al., 1979) zeigten ähnliche Ergebnisse.

Die Ursache für die hohen Schwankungen der individuellen Lymphozytenantwort ist nicht eindeutig geklärt. Neben zyklischen Schwankungen in der Anzahl der zirkulierenden Lymphozyten (Shaw, 1927) wurden auch Schwankungen in der DNA-Synthese

(Hallberg, 1969) beobachtet. Ferner verursacht jede Erhöhung des Adrenalinpiegels eine starke Lymphozytose (Garrey und Bryan, 1935). Außerdem können physiologische Veränderungen die Zahl der T-Zellen und das Ausmaß der T-Zell-Immunantwort im peripheren Blut beeinflussen (Angus und Yang, 1978).

4.2.2.: Versuchsergebnisse

4.2.2.1.: *Echinacea angustifolia*

Echinacea angustifolia Urtinktur induzierte sowohl in wässriger als auch in alkoholischer Lösung in den getesteten Konzentrationen bei Lymphozyten von Kontrollhühnern nur sehr geringe Stimulation. Eine Abhängigkeit von der zugesetzten Echinaceakonzentration konnte nicht eindeutig nachgewiesen werden. Kulturen nach dreitägiger Kultivierung mit *Echinacea* zeigen höhere Proliferationsraten (Fig. 1/ Fig. 3) als 6-Tage-Kulturen.

Im Gegensatz dazu erzielte PWM höhere Stimulationswerte. Interessanterweise induziert Alkohol in vorliegender Arbeit bei Zugabe zu in vitro Lymphozytenkulturen einen ähnlich proliferationssteigernden Effekt wie *Echinacea* und PWM.

In den vergleichenden Untersuchungen mit *Echinacea* in alkoholischer Lösung und Alkohol wurde kein Unterschied der Stimulations-Indices an Tag 3 oder Tag 6 beobachtet. Proksch (1982) hingegen beschreibt keine mitogene Aktivität im Lymphozyten-Transformations-Test mit alkoholischen *Echinacea*-Gesamtextrakt. Über den Einfluß von Alkohol auf das Immunsystem von Tieren liegen ausgesprochen heterogene Ergebnisse vor.

Bezüglich der Zytotoxizität der Natural-Killer-Cells von Maus und Ratte wurde bei geringen Zugaben von Äthanol sowohl Hemmung (Ristow et al., 1982; Stacey, 1984) als auch Stimulierung (Rice et al., 1983) beobachtet. Als Ursache wurde

eine mögliche, konzentrationsabhängige Hemmung der Bindung des Effektors an die Zielzelle diskutiert.

Neben einer signifikanten Steigerung der in vitro Chemotaxis von humanen polymorphkernigen Granulozyten, einer signifikanten Erhöhung der Adhärenz dieser Zellen bei Zugabe von 0.02 % Alkohol (Hallengren und Forsgen, 1978), wurde bei mehrfacher Verabreichung von Alkohol an Meerschweinchen ein signifikanter Anstieg der Gesamtimmunglobulinkonzentration (Caizza und Ovary, 1976) beobachtet. Klumpp (1986) untersuchte an verschiedenen Hühnerlinien den Einfluß von Äthanol (0.1 ml/kg Körpermasse) auf das Abwehrsystem und wies mittels ELISA und Rocket-Immunelektrophorese nach, daß Alkohol neben einer minimalen Steigerung der Phagozytoseaktivität eine erhöhte Bildung von IgA-Antikörpern nach Immunisierung von Kontrolltieren und eine vermehrte IgG-Antikörperproduktion bei UM-B 19 Hühnern induziert wurde (Tisman et al., 1973; Atkinson et al., 1977; Liu, 1980).

Verschiedene Autoren beschrieben eine deutliche Hemmung der Lymphozyten-Transformation in vitro bei einer Äthanolkonzentration von 0.1 %.

Bei der in dieser Arbeit untersuchten Äthanolkonzentration (35 %) wurde sowohl an Tag 3 als auch an Tag 6 eine Proliferationsfördernde Wirkung beobachtet (Fig. 3; Fig. 4). Die Zugabe von Echinacea in verschiedenen Darreichungsformen und verschiedenen Konzentrationen hatte keinen signifikant hemmenden oder verbessernden Einfluß auf die Überlebensfähigkeit aviärer Lymphozyten nach drei bzw. sechstägiger Kultivierung.

4.2.2.2.: Influe^x

Die Kombinationspräparate Influe^x-Tropfen und Influe^x injectabile unterscheiden sich in ihrer Rezeptur. Die Tropfen enthalten Echinacea angustifolia als Urtinktur, daneben, abweichend von Influe^x injectabile, Aconitum und Apis mellifica. Influe^x injectabile besteht aus Echinacea angustifolia D 1, Eupatorium perfoliata, Gelsemium und Vitamin C.

Lachesis ist in beiden Arzneimitteln vorhanden.

Für diese Arbeit wurden die Influe^x_R-Tropfen entalkoholisiert und in wässriger Lösung vorgelegt (Influe^x_R in wässriger Lösung) um eine Beeinflussung durch Alkohol zu vermeiden. Das handelsübliche Präparat enthält 35 % (v/v) Äthanol. Influe^x_R injectabile beinhaltet so geringe Mengen von Alkohol (< 5 %, v/v; Okpanyi, persönliche Mitteilung), daß seine Entfernung nicht notwendig erschien.

Influe^x_R in wässriger Lösung zeigte konzentrationsabhängige geringe Stimulations-Indices an den Tagen 3 und 6 wobei die Werte gegenläufig waren (Fig. 7; Fig. 8). Auf Grund der hohen Standardabweichung konnte kein signifikanter Unterschied zwischen Tag 3 und Tag 6 festgestellt werden.

Influe^x_R dagegen zeigte keinerlei stimulierende Wirkung auf Hühnerlymphozyten.

Bezüglich der Zellzahl wurde in Kulturen mit Influe^x_R in wässriger Lösung an Tag 3 kein Unterschied zu Kulturen ohne Zusätze oder mit PWM gefunden.

An Tag 6 zeigten die Ansätze mit PWM signifikant mehr intakte Lymphozyten als Vergleichskulturen mit Influe^x_R in wässriger Lösung.

Influe^x_R injectabile wirkt sich mit Ausnahme der Konzentration von 500 µl/10 ml hemmend auf die Anzahl der überlebenden Zellen an Tag 3 aus (Fig. 7). Auch an Tag 6 zeigt Influe^x_R injectabile, außer bei 500 µl/10 ml hemmende Wirkung auf die Zellzahl. Der hohe Wert bei 1000 µl/10 ml kann wegen der geringen Tierzahl und der extrem hohen Streuung nicht berücksichtigt werden.

4.2.2.3.: Vergleichende Betrachtung

In der vorliegenden Arbeit sollte die mitogene Wirkung verschiedener Echinacea enthaltender Präparate anhand des Lymphozyten-Transformations-Tests untersucht werden. Die Versuche wurden an peripheren Lymphozyten von immunologisch

intakten Hühnern durchgeführt.

Verschiedene Autoren (Weinbaum et al., 1973; Geha, 1974; Sarvas et al., 1974; Evans und Ivanyi, 1975; Miggiano et al., 1976; Choi, 1977; Schauenstein et al., 1982; Geha, 1974) zeigten, daß die T- und B-Zell-Kooperation bei Huhn und Säugetier, trotz der unterschiedlichen Organisation der Lymphozytendifferenzierungsorgane, nahezu gleichartig abläuft. Die nach mitogener Stimulation von aviären Lymphozyten gefundenen Ergebnisse sind darum mit den bei humanen Lymphozyten erzielten Resultaten vergleichbar.

Trotz der von Prügner (1982) unter diesen Kulturbedingungen gefundenen eindeutigen Stimulation von Hühnerlymphozyten nach PWM-Zugabe wurde bei dieser Untersuchung nach PWM-Zugabe (100 μ l/10 ml) an Tag 6 im Mittel keine höheren Stimulations-Index-Werte als 7.03 (Tab. 14) nachgewiesen. Die Proliferationsraten der Einzeltiere erreichten Werte bis 22.04 (Tab. 14). Die bei Pink (1979) und Vainio (1984) beschriebenen low responders ($SI < 5$) in Inzuchtlinien, können für die generell zu niedrige Proliferation mit PWM nicht verantwortlich gemacht werden, da bei einer an Tag 6 gesamt getesteten Tierzahl von $n=57$ ein Anteil von low responder Tieren ($n=38$) weit über dem sonst bei Hühnern gefundenen Anteil liegt. Möglicherweise hat die in dieser Arbeit gefundene geringe mitogene Aktivität von PWM ihre Ursache in einer weniger aktiven Charge, veränderter Qualität des Serumzusatzes oder am Tiermaterial (Belastung durch vermehrte Blutentnahme; Einfluß einer nicht manifesten Infektion).

Von den Echinacea-Monopräparaten erwies sich sowohl die wässrige als auch die alkoholische Lösung in geringem Grad als mitogen. Das alkoholische Präparat erzielte bei höherer, optimaler Konzentration (200 μ l/10 ml) auch höhere Mittelwerte der Stimulations-Indices als das wässrige Präparat bei seiner optimalen Konzentration von 50 μ l/10 ml. Bezüglich ihrer Wirkungskinetik zeigten beide Präparate an Tag 3 höhere Proliferationsraten als an Tag 6.

Das Mischpräparat Influe^x_R (in wässriger Lösung) induzierte von allen getesteten Echinacea-Präparaten die höchsten Stimulations-Indices. Die größte Proliferationsrate wurde mit einer Konzentration von 200 μ l/10 ml an Tag 6 erzielt.

Somit erscheinen die Zusatzstoffe in Influe^x_R (in wässriger Lösung) Hühnerlymphozyten zu vermehrter Proliferation anzuregen, wobei die Wirkung erst nach längerer Kultivierung auftritt.

Dagegen zeigte das Mischpräparat Influe^x_R injectabile keine mitogen Eigenschaften.

Die Anzahl der lebenden Zellen nach drei- bzw. sechstägiger Kultivierung ließ keine zytotoxischen Eigenschaften der getesteten Präparate erkennen.

Ein stoffspezifischer Vergleich der verschiedenen Echinacea-Präparationen ist nicht möglich, da besonders bei den Mischpräparaten die Wirkung der einzelnen Zusatzstoffe auf die Zellkultur noch nicht untersucht wurde. Inwieweit Echinacea-Präparate im peripheren Blut bestimmte Lymphozytenfraktionen - T- und B-Lymphozyten oder andere Zellfraktionen - stimulieren ist ungenügend erforscht. Der Lymphozyten-Transformations-Test und der Jerne-Plaque-Test ergaben, daß die aus Echinacea gewonnenen Polysaccharid-Gesamt-Fraktion in erster Linie T- und B-Zellen aktiviert (Proksch, 1982).

Bekannt ist auch eine Wirkung auf die Lymphozyten in vivo, da nach oraler oder intramuskulärer Applikation von Echinacea Urtinktur und Influe^x_R die Serum-IgG-Konzentration sowohl in Kontroll- als auch in dysgammaglobulinämischen UM-B 19 Hühnern ansteigt. Würdinger (1986) erzielte außerdem mit Influe^x_R in wässriger Lösung einen Anstieg der IgM-Synthese in Kontrolltieren und signifikant erhöhte Serum-IgA-Werte nach Verabreichung dieser Präparate.

Klumpff bestätigte 1986 die erhöhte IgG-Synthese von UM-B 19 Hühnern nach Verabreichung von Influe^x_R in alkoholischer Lösung.

5. Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit wurde die mitogene Wirkung von Echinacea enthaltenden Mono- und Mischpräparaten auf periphere Blutlymphozyten von Leghorn Hühnern anhand des ^3H -Thymidineinbaus untersucht.

Getestet wurde Echinacea angustifolia Urtinktur sowohl in wässriger als auch in alkoholischer Lösung und die beiden Mischpräparate Influe^x_R in wässriger Lösung und Influe^x_R injectabile.

Die Wirkung der Präparate wurde in verschiedenen Dosierungen und nach unterschiedlicher Kultivierungsdauer getestet. Als Vergleich wurden Kulturen mit PWM, in einigen Fällen auch mit Alkohol alleine stimuliert.

Echinacea erwies sich sowohl in wässriger als auch in alkoholischer Lösung als stimulierend, wobei das alkoholische Präparat höhere Stimulations-Indices induzierte. Beide Darreichungsformen erzeugten an Tag 3 höhere Proliferationsraten als an Tag 6.

Im Gegensatz zu Influe^x_R injectabile, das sich in diesen Versuchen als nicht mitogen erwies, zeigten mit Influe^x_R in wässriger Lösung stimulierte aviäre Lymphozyten an Tag 6 die höchsten Stimulationswerte - sowohl im Vergleich mit PWM als auch bezogen auf die anderen untersuchten Präparate.

6. Summary

Mitogenic stimulation of chicken lymphocytes by *Echinacea angustifolia* and Influx^R in vitro

In the present work is the mitogenic effect of echinacea-containing single and mixed preparations on leghorn chicken peripheral blood lymphocytes investigated by means of ³H-thymidine incorporation.

Echinacea angustifolia was tested as extract in both aqueous and alcoholic solution, along with the two mixed preparations Influx^R in water and Influx^R injectabile.

The effects of the preparations were tested in various dosages and after varying cultivation times. As a comparison, cultures were stimulated with PWM, in some cases with alcohol alone.

Echinacea proves to be stimulating in both aqueous and alcoholic solution, with the alcoholic preparation inducing a higher stimulation index. Both types generated greater proliferation on day 3 than on day 6.

In contrast to Influx^R injectabile, which in this experiment proved not to be mitogenic, Influx^R in water showed on day 6 the greatest stimulation of avian lymphocytes in comparison with PWM as well as with the other preparations investigated.

7. Literaturverzeichnis

Angus, K. and T.J. Yang

Lymphocyte response to phytohemagglutinin: Temporal variation in normal dogs

J. Immunol. Meth. 21, 261 (1978)

Arthus, P. (1920)

Aus: Int. Encyclop. of Pharmacol. a. Therap.

Sect. 71, Vol II Pharmacol. a. Toxicol. of Natur -
Occur. Toxins

Pergamon Press L.O.C.C.C.N. 77 130797 p.117, 122
(1971)

Askonase, B.A., A. Schimpl and E. Wecker

The differentiation function of T cell replacing factor
in nn/nn spleen cultures

Eur. J. Immunol. 4, 164 (1974)

Becker, H.

Gegen Schlangenbiß und Grippe . Verwendung und
Inhaltsstoffe von Echinacea angust. und Echinacea purp.

Deutsche Apotheker Zeitung 45, 122 Jhrg. 2320 (1982)

Benedict, A.A., L.Q. Tam, T.C. Chan, L.W. Pollard,

H.A. Abplanalp and M.E. Gershwin

Inherited 7 S immuglobulin deficiency in chickens:

Late onset dysgammaglobulinemia and evaluation of the
lymphocyte proliferative responses and other immunologic functions.

Clin. Immunol. Immunopathol. 17, 1 (1980)

Bernheim, J.L., R.E. Dorian and J. Mendelson

DNA synthesis and proliferation of human lymphocytes in
vitro: I.: Cell kinetics of response to phythemagglutinin

J. Immunol. 120 , 955 (1978)

Bohlmann, F. und M. Grenz

Über die Inhaltsstoffe aus Echinacea-Arten
Chem. Ber. 99, 3197 (1966)

Bösing-Schneider, R. and M. Haug

Role of cyclic AMP in differentiation of T- and
B-lymphocytes during the immun induction
Cell. Immunol. 27, 121 (1967)

Böyum, A.

Isolation of mononuclear cells and granulocytes from
human blood
Scand. Clin. Lab. Invest. 21,(Suppl.), 77 (1968)

Bonadeo, J., G. Botazzi et M. Lavazza

Polisaccharide attivo dell' Echinacea.
Riv.Ital. Essenze- Profumi officin.- Aromi - Saponi -
Cosmetici - Aerosol 53, 281, (1971)

Braun, H.

Arzneipflanzen-Lexikon
Gustav Fischer Verl. Stuttgart-New York (1979)

Büsing, K.-H.

Hyaluronidasehemmung durch Echinacin
Arznm.-Forschung 2, 467 (1952)

Büsing, K.-H. und G. Thürigen

Über die Wirkung von Pflanzeninhaltsstoffen auf das
Komplement- und Properdinsystem
Allergie und Asthma, 4, 30 (1958)

Caizza, S.S. and Z. Ovary

Effects of ethanol intake on the immune system of
guinea pigs

J. stud. alcohol 37, 959 (1976)

Chan, T.C., A.A. Benedict, L.Q. Tam, H. Abplanalp and
M.E. Gershwin

Inherited 7 S immunoglobulin deficiency in chickens:
presences of suppressor T-cells, that suppress synthe-
sis of 7 S immunoglobulin but not IgM

J. Immunol., 125, 108 (1980)

Chone, B. and G. Manidakis

Echinacin-Test zur Leukozytenprovokation bei effektiver
Strahlentherapie

Deutsche Med. Wochenschrift 27, 1406 (1969)

Choi, Y.S.

Biosynthesis and secretion of antibodies by chicken
lymphoid cells. II.: Cooperation between carrier-spe-
cific T and hapten-specific B-lymphocytes for the
development of antihapten immune response
Immunochem. 14, 59 (1977)

Chubrasik, S. und J. Chubrasik

Kompodium der Phytotherapie
Hippokrates Verl. Stuttgart

ISBN 3-7773-0618-5, S. 122 (1983)

Cockerell, C., E.A. Hoover, F. Lo Buglio and D.S. Yohn

Phytomitogen- and antigen-induced blast transformation
of feline lymphocytes

Am. J. Vet. Res. 36, 1489 (1979)

Coutinho, A. and G. Möller

Thymus independent B-cell induction and paralysis
Adv. Immunol. 21, 113 (1975)

Diamantstein, T. and A. Ulmer

The antagonistic action of cyclic GMP and cyclic AMP
on proliferation of B- and T-lymphocytes

Immunol. 28, 113 (1975)

Drews, J.

Möglichkeiten der Immunstimulation
Swiss Pharma 2, 9 (49) (1980)

Efrati, D. and P. Reif

Internat. Encyclop. of Pharmacol. a Therap. Sect. 71,
Vol. II, Pharmacol. and Toxicol. of Natur.- Occur.
Toxins
Pergamon Press C.O.C.C.C.N. 77.130797 p. 117 (1971)

Evans, G. and J. Ivanyi

Antibody synthesis by chicken spleen cells in vitro.
I.: Requirements of B cells at various stages after
immunisation for T cells, macrophages and antigen
Eur. J. Immunol. 5, 747 (1975)

Fauci, A.S. , K.R.K. Pratt and G. Wahlen

Activation of human lymphocytes.
II: Cellular interactions in the PFC responses of human
tonsillar and blood B-lymphocytes to polyclonal
activation by PWM
J. Immunol. 117, 2100 (1976)

Feldberg and Kellaway (1937)

Internat. Encyclop. of Parmacol. a. Therap. Sect. 71
Vol II, Pharmacol. a. Toxicol of Natur-Occur. Toxins
Pergamon Press L.O.C.C.C.N. 77, 130797, 117 (1971)

Funke, H.

Neue Erkenntnisse über Echinacea
Zeitschrift für Phytotherapie 4, 650 (1983)

Garrey, W.E. and W.R. Bryan

Variations in white blood cell counts
Physiol. Rev. 15, 597, (1935)

Gassinger, C.A., G. Wünstel und P. Netter

Klinische Prüfung zum Nachweis der therapeutischen
Wirksamkeit des homöopathischen Arzneimittels Eupatorium
perfol. D2 (Wasserhanf Composite) bei der Diagnose
"Grippaler Infekt"

Arznm.-Forschung 31 (I), 732 (1981)

Geha, R.S. und E. Merler

Response of human thymus-derived (T) and non-thymus-de-
rived (B) lymphocytes to mitogenic stimulation in vitro
Eur. J. Immunol. 4, 193 (1974)

Greaves, M.F., J.J.T. Owen and M.C. Raff

Responses of T- and B- lymphocytes in vitro

In: T- and B-lymphocytes: Origins, properties and roles
in immune responses

Excerpta Medica, Amsterdam pp 85 (1975)

Hadden, J.W. , E.M. Hadden M.K. Haddox and N.D. Goldberg

Guanosin 3':5'-cyclic monophosphate: a possible intra-
cellular mediator of mitogenic influences in
lymphocytes

Proc. nat. Acad. Sci. (Wash.) 69, 3024 (1972)

Hänsel, R.

Unspezifische Reizkörpertherapie:

Das Arzneimittelangebot aus pharmazeutischer Sicht
Zeitschrift für Phytotherapie 6, 1 (1985)

Hallberg, G.

Variations in DNA-synthesis rate of lymphocytes

Ann. Rev. Physiol. 31, 675 (1969)

Hallengren, B. and A. Forsgren

Effect of alcohol on chemotaxis, adherence and phago-
cytosis on human polymorphonuclear leucocytes

Acta. Med. Scand. 43, 204 (1978)

Hare, W.C.D.

The in vitro incorporation of tritium 3 Thymidine into
the mononuclear cells of the peripheral blood of cattle
Am. J. Vet. Res. 24, 98 (1963)

Heyl, F.W. and J. Stanley

Analysis of two echinacea roots
Am. J. Pharmacy 86, 450 (1914)

Heyl, F.W. and M.C. Hart

Constituents of the root of *Brauneria angust.*
J. Am. Chem. Soc. 37, 1769 (1915)

Hirschhorn, R., J. Grossman and G. Weissmann

Effect of cyclic 3':5'- adenosine monophosphate and
theophylline on lymphocyte transformation
Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 133, 1361 (1970)

Hirschhorn, K. and R. Hirschhorn

Mechanisms of lymphocyte activation
In: Mechanisms in cell-mediated immunity
(Ed. Mc Cluskey R.T. and S. Cohen), J. Wiley and sons
Sidney, Toronto p 115 (1974)

Hovi, T. J. Suni, L. Hortling and A. Vaheri

Stimulation of chicken lymphocytes by T and B cell
mitogens
Cell. Immunol. 39, 70 (1978)

Jacobson, M., R.E. Redfern and G.D. Mills jr.

Naturally occurring insect growth regulators.
3.Echinolone, a highly active juvenile hormone mimic
from *Echinacea angust. roots*
L. Loydia 38, 473 (1975)

Janossy, G., E.G. De la Concha, A. Luquetti, M.J. Snajdr,
M.J. Waxdall and T.A.E. Platts-Mills

T cell regulation of Ig synthesis and proliferation in
PWM (Pa-1)-stimulated human lymphocyte cultures
Scand. J. Immunol. 6, 109 (1977)

Kaplan, M.S., V.S. Byers, A.S. Levin, D.F. German,
H.H. Fudenberg and L.N. Lecom

Circadian rhythm of stimulated lymphocyte blastogenesis.
A 24 hour cycle in the mixed leucocyte culture reaction
and with SKSD stimulation
J. Allergy Clin. Immunol. 58, 180 (1976)

Keightley, R.G., M.D. Cooper and A.R. Lawton

The T cell dependence of B cell differentiation indu-
ced by PWM
J. Immunol. 117, 1538 (1976)

Keller, H.

Patent Chemie Grünenthal, DBP 930674 K1 30 h (1955)

Kirchner, H. and J.J. Oppenheim

Stimulation of chicken lymphocytes in a serum-free
medium
Cell. Immunol. 3, 695 (1972)

Klumpp, N.

In vivo Untersuchung zur Wirkung oral verabreichten
Alkohols bzw. Influenza^R auf das Abwehrsystem
verschiedener Hühnerlinien
Diss. Universität München (1986)

Koch, F.E. und H. Haase

Eine Modifikation des Spreading-Tests im Tierversuch,
gleichzeitig ein Beitrag zum Wirkungsmechanismus von
Echinacin
Arznei.-Forschung 2, 464 (1952)

Koch, F.E. und H. Uebel

Experimentelle Untersuchungen über die lokale Beeinflussung der Geweberesistenz gegen Streptokokkeninfektion durch Cortison und Echinacin
Arznm.-Forschung 4, 551 (1954)

Kuhn, O.

Echinacin und Phagozytose-reaktion
Arzneim.-Forschung 3, 194 (1953)

Larsen, H.J.

A whole blood method for measuring mitogen-induced transformation of sheep lymphocytes
Res. Vet. Sci. 27, 334 (1979)

Leeser, O.

Lehrbuch der Homöopathie
Spez. Teil: Arzneimittellehre, B II Pflanzliche Arzneistoffe
ISBN: 3-7760-0229-8
Karl Haug Verlag, Heidelberg (1971)

Letwin, B.W. and F.W. Quimby

The effect of Concanavalin A (Con A), Phytohemagglutinin (PHA) and Pokeweed Mitogen (PWM) on canine lymphocytes in vitro
J. Leucocytes Biol. 38 (1), 176 (1985)

Leventhal, B.C., J.J. Oppenheim

Effect of cell density on the rate and degree of response of leucocytes and purified lymphocyte cultures
Proc. Third Annual Leucocyte Culture Conference
ed: Riecke, co. o.p.13-29 Appelton-Century-Craft
New York 1969

Liu, Y.K.

Effects of alcohol on granulocytes and lymphocytes
Seminars in Hematology 17, 130 (1980)

Lohrmann, H.-P., C.M. Graw and R.G. Graw jr.

Stimulated lymphocyte cultures. Responder recruitment
and cell cycle kinetics
J. Exp. Med. 139, 1037 (1974)

Loor, F.

Binding and redistribution of lectins on lymphocyte
membrane
Eur. J. Immunol. 4, 210 (1974)

Mayr, A.

Paramunität und Paramunisierung
Mh. Vet.-Med. 40, 12 (1985)

Meißner, F.

Diss. Universität München (1980)

Miggiano, V., M. North, A. Buder and J.R.L. Pink

Genetic control of the response of chicken leucocytes
to a T cell mitogen
Nature 263, 61 (1976)

Möse, J.R.

Zur Wirkung von Echinacin auf Phagozytoseaktivität und
Natural Killer Cells
Med. Welt 51/52 1463 (1983)

Moorhead, J.F., Conally J.J. and W. McFarland

Factors affecting the reactivity of human lymphocytes
in vitro. I. Cell number, duration of culture and
surface area
J. Immunol. 99, 413 (1967)

Muscoplat, C.C., A.W. Chen, D.W. Johnson and J. Alhaji

In vitro stimulation of bovine peripheral blood lymphocytes: Standardisation and kinetics of the response
Am. J. Vet. Res. Vol 35, Nr 12, 1557 (1974)

Neumann, G.

In: Internat. Encyclop. of Pharmacol. a. Therap.
Sect. 71, Vol. II Pharmacol. a. Toxicol. of Natur.
Occur. Toxins
Pergamon Press L.O. C.C.C.N. 77, 130797, 117 (1971)

Orinda, J., J. Diederich and A. Wacker

Antivirale Wirkung der Composite Echinacea purpurea
Arzneim.-Forschung 23, 1119 (1973)

Orzechowski, G.

Plant polysaccharides for the enhancement of endogeneous defense
Med. Welt 6 , 293 (1963)

Otto, F. und D.O. Schmid

Lymphzytenisolierung aus dem Blut des Menschen und der Tiere
Blut 21, 118 (1970)

Pink, J.R.L.

Lectin-binding products of the Chicken Major Histocompatibility Complex
Fol. biol. 25, (1979)

Proksch, A.

Über ein immunstimulierendes Wirkprinzip aus Echinacea purp.
Diss. Universität München (1982)

Prügner, W.

Untersuchung zur Con A bzw. PWM induzierten Stimulierbarkeit der Lymphozyten von UM-B 19 Hühnern
Diss. Universität München (1982)

Reißmann, G.

Unspezifische Reizkörpertherapie und Properdinsystem
Fol. Haematol. 85, Bd 2, 2 (1965)

Rice, C., D. Hudig, P. Lad and J. Mendelsohn
Ethanol activ of human natural cytotoxicity
Immunopharmacol. 6, 303 (1983)

Ritschel, W.A.

Angewandte Biopharmazie
Wissenschaftl. Verlagsgemeinschaft MBH Stuttgart (1973)

Ristow, S.S., J.R. Starkey and G.M. Hass

Inhibition of natural killer cell activity in vitro by alcohols
Biochem. Biophys. Res. Commun. 105, 1315 (1982)

Robinson, G.A., R.W. Butcher and E.W. Sutherland

In: Cyclic AMP, Academic Press Inc. New York (1971)

Rote Liste 1986

Bundesverband der Pharmazeutischen Industrie e. V.
Frankfurt a. Main BRD

Roth, A., F. Daunderer und S. Kormann

Giftpflanzen - Pflanzengifte
ISBN 3-609-64810-4, 5-6 (1984)

Sarvas, H., O. Mäkelä and P. Toivanen

Effect of carrier preimmunisation on the anti-hapten response in the chicken
Scand. J. Immunol. 3, 455 (1974)

Schauenstein, K. A. Globerson and G. Wick

Avian lymphokines: I. Thymic cell growth factor in supernatants of mitogen stimulated chicken spleen cells
Dev. Comp. Immunol. 6, 533 (1982)

Schellekens, P.Th.A. and V.P. Eijssvoegel

Lymphocyte transformation in vitro: I. Tissue culture conditions and quantitative measurements
Clin. Exp. Immunol. 3, 571 (1968)

Schütterle, E.P.

Über die körpereigene Infektabwehr und die Wirkung einer unspezifischen Reizkörpertherapie
Therapiewoche 20, 23, 1091 (1970)

Schulte, K.E., G. Rücker und J. Perlick

Das Vorkommen von Polyacetylen-Verbindungen in Echinacea purp. und Echinacea angust. D.C.
Arznm.-Forschung 17, 825 (1967)

Shaw, A.F.B.

The diurnal tide of the leucocytes of man
J. Pathol. Bacteriol. 30, 1 (1927)

Shortman, K., W.J. Byrd, J.-C. Cerottini and K.T. Brunner

Charakterisation and separation of mouse lymphocyte subpopulation responding to phytohemagglutinin and pokeweed mitogen
Cell. Immun. 6, 25 (1973)

Smith, J., A.L. Steiner and C.W. Parker

Human lymphocyte metabolism. Effects on cyclic and non cyclic nucleotides on stimulation by phytohemagglutinin

J. Clin. Invest. 50, 442 (1971)

Stacey, N.H.

Inhibition of antibody dependent cell-mediated
cytotoxicity by ethanol
Immunopharmacol. 8, 155 (1984)

Stoll, A. J. Renz and A. Brack

Isolierung und Konstitution des Echinacosids, eines
Glycosids aus den Wurzel von Echinacea angust.
Helvet. Chem. Acta 33, 1877 (1950)

Tisman, G und V. Herbert

In vitro myelosuppression and immunosuppression by
ethanol
J. Clin. Invest. 52, 1410 (1973)

Vainio, O. and M.J.H. Ratcliffe

Proliferation of chicken peripheral blood leucocytes
in response to PWM is monophage dependent
Cell. Immun. 85 (1), 235 (1984)

Van Dam, R.H. R.J.S. Van Kooten and J.A. Van der Donk

In vitro stimulation of goats peripheral blood
lymphocytes: Optimization and kinetics of the response
to mitogens and to allogenic lymphocytes
J. Immunol. Meth. 21, 217 (1978)

Verelis, L.

Untersuchung der lipophilen Inhaltsstoffe von Radix
Echinacea angust. D.C.
Dissertation Universität Heidelberg (1978)

Vischer, T.L.

The differential effect of cyclic AMP on lymphocyte
stimulation by T- or B-cell mitogens
Immunol. 30, 735 (1976)

Wacker, A. und W. Hilbig

Virushemmung mit Echinacea purp.

Planta med. 33, 89 (1978)

Wagner, H.

Arzneimittelpflanzen zur Steigerung der körpereigenen
Immunabwehr

Naturheilprax. 3, 256 (1983)

Wagner, H.

Immunprophylaxe und -therapie durch Pflanzenpräparate

Z. Allg. Med. 59, 1282 (1983)

Wagner, H., A. Proksch, J. Riess-Maurer, A. Vollmar,

S. Odenthal, H. Stuppner, K. Jurcic und M. Le Turdu

Immunstimulierend wirkende Polysaccharide

(Heteroglykane) aus höheren Pflanzen

Arznm.-Forschung 35 (II), Nr 7, 2 (1985)

Wagner, H.

Vortrag im Tierphysiologischen Institut der Univer-
sität München (1986)

Weber, W.T.

Direct evidence for the response of B and T cells
to PWM

Cell. Immunol. 9, 482 (1973)

Weber, W.T.

Response of chicken T and B cells to soluble and
insoluble forms of Pokeweed Mitogen, Concanavalin A,
to Lipopolysaccharide and to anti-immunglobulin serum
Fed. Proc. 32 (1973)

Weber, W.T.

The in vitro response of chicken B cell populations in

in Lipopolysaccharide

J. Immunol. 4, 1277 (1973)

Waxdal, M.J. and T.Y. Basham

B and T cell stimulatory activities of multiple
mitogens from PWM

Nature 251, 163 (1974)

Weinbaum, F.J., D.G. Gilmour and G.J. Thorbecke

Immunocompetent cells in the chicken. III.: Cooperation
of carrier sensitised T cell from agamaglobulinemic
donors with hapten immun B cells

J. Immunol. 11, 1434 (1973)

Whistler, R.L., A.A. Bushway, P.P. Singh, W. Nakahara and
R. Tokuzen

Noncytotoxic antitumor polysaccharides

Adv. Carbohydr. Chem. Biochem. 82, 235 (1976)

Wirth, W. und Ch. Gloxhuber

Aus: Toxikologie: für Ärzte, Naturwissenschaftler und
Apotheker

Thieme-Verlag ISBN 3-13-421103-3, 337 (1981)

Würdinger, M.

Beeinflussung der humoralen Immunreaktionen durch
Influe^x_R und Echinacea angust. Extrakt

Diss. Universität München (1986)

TABELLARISCHER ANHANG

Tab. 1

Echinacea in wässriger Lösung(rad. sicc.) und PWM

Stimulations-Indices an Tag 3

Echinacea Stammlösung: 1 mg/ml

V= Versuch

T= Tier

Ech.- Konz.:	50 μ l	100 μ l	200 μ l	PWM (100 μ l)
V 19 T ₁	-	0.53	-	0.42
T ₂	6.8	6.8	1.93	7.52
T ₃	1.94	1.06	1.09	1.73
T ₄	-	2.77	3.3	0.9
V 20 T ₂	-	0.75	-	0.77
T ₃	1.4	1.2	1.19	1.11
T ₄	-	1.75	2.31	2.14
V 21 T ₃	1.08	1.57	1.84	1.53
V 23 T ₁	1.39	0.9	-	1.65
T ₃	1.58	1.46	1.74	1.28
T ₄	5.03	2.33	-	3.75
$\bar{x}$	2.74	1.92	1.91	2.07
SD	2.23	1.75	0.74	2.01
V	5.01	3.06	0.55	4.04

Tab. 2

Echinacea in wässriger Lösung (rad. sicc.) und PWM

Stimulations-Indices an Tag 6

Echinacea-Stammlösung: 1 mg/ml

V= Versuch

T= Tier

Ech.-						
Konz.:		50 μ l	100 μ l	150 μ l	200 μ l	PWM (100 μ l)
V 18	T ₁	0.98	0.87	0.59	-	2.02
	T ₂	-	-	2.91	-	0.94
	T ₄	2.25	1.11	1.52	-	2.8
V 19	T ₁	-	2.06	-	-	1.71
	T ₂	0.47	0.5	-	-	0.67
	T ₃	4.1	4.46	-	0.93	0.63
	T ₄	3.98	0.98	-	0.80	5.7
V 21	T ₁	4.9	1.6	-	-	3.5
	T ₂	-	0.5	-	-	4.43
	T ₄	0.4	0.49	-	0.11	1.03
V 22	T ₁	2.57	2.84	-	2.1	2.87
	T ₂	0.93	1.94	-	-	1.67
	T ₃	-	0.78	-	-	1.54
	T ₄	2.1	-	-	-	4.89
V 23	T ₁	-	1.67	-	-	8.81
	T ₂	-	0.9	-	-	2.83
	T ₃	-	0.3	-	-	3.43
-						
x		2.26 ^{ab}	1.40 ^a	1.67 ^{ab}	0.98 ^{ab}	2.91 ^b
SD		1.61	1.10	1.16	0.82	2.13
V		2.61	2.22	1.36	0.68	4.54

a,b, signifikant unterschiedlich (p < 0.05)

Tab. 3

Echinacea in wässriger Lösung (rad. sicc.) und PWMZellzahlen($\times 10^6$ /ml) an Tag 3

Echinacea-Stammlösung: 1 mg/ml

V= Versuch

T= Tier

Ech.- Konz.:	50 μ l	100 μ l	200 μ l	PWM (100 μ l)	0-Wert
V 19					
T ₁	-	6.08	-	6.88	8.24
T ₂	9.84	12.16	7.68	8.72	16.52
T ₃	8.24	9.68	8.12	8.88	8.56
T ₄	-	6.40	7.04	7.88	6.24
V 20					
T ₂	-	7.64	-	8.32	7.76
T ₃	8.16	7.72	8.68	6.64	8.76
T ₄	-	6.8	6.28	4.6	6.52
V 21					
T ₃	6.2	4.64	4.72	7.2	8.6
V 23					
T ₁	10.56	11.44	-	12.16	12.24
T ₃	8.04	6.96	6.36	5.8	7.08
T ₄	5.24	6.24	-	13.64	9.72
$\bar{x}$	8.04	7.79	6.11	8.24	9.11
SD	1.86	2.34	2.75	2.64	2.95
V	3.47	5.48	7.61	6.99	8.74

Tab. 4

Echinacea in wässriger Lösung (rad. sicc.) und PWMZellzahlen ($\times 10^6/\text{ml}$) an Tag 6

Echinacea-Stammlösung: 1 mg/ml

V= Versuch

T= Tier

Ech.- Konz.:		50 μl	100 μl	150 μl	200 μl	PWM (100 μl)	0-Wert
V 18	T ₁	1.04	0.76	0.74	-	0.86	0.7
	T ₂	-	-	1.16	-	0.98	1.78
	T ₄	1.14	1.44	1.56	-	2.0	1.58
V 19	T ₁	-	3.72	-	-	2.96	2.6
	T ₂	1.4	0.96	-	-	3.28	2.16
	T ₃	1.8	1.32	-	1.02	2.68	1.28
	T ₄	1.84	1.88	-	1.3	1.84	1.0
V 21	T ₁	2.2	2.16	-	-	1.92	2.84
	T ₂	-	6.6	-	-	5.72	4.72
	T ₄	1.48	1.92	-	1.76	1.48	1.52
V 22	T ₁	2.4	3.28	-	2.76	2.8	3.0
	T ₂	6.12	6.72	-	-	8.36	6.96
	T ₃	-	2.8	-	-	2.6	1.6
	T ₄	2.36	-	-	-	2.32	2.36
V 23	T ₁	-	3.8	-	-	9.12	5.88
	T ₂	-	2.8	-	-	2.04	5.36
	T ₃	-	3.08	-	-	3.6	2.24
$\bar{x}$		2.17	2.88	1.15	1.71	3.20	2.79
SD		1.46	1.80	0.41	0.63	2.36	1.83
V		2.14	3.24	0.16	0.58	5.59	3.34

Tab. 5

Echinacea in alkoholischer Lösung, PWM und Alkohol (35 %ig)

Stimulations-Indices an Tag 3

Echinacea-Konz.: 0.1 g/ml

V= Versuch

T= Tier

Ech. Konz.:	50 µl	100 µl	200 µl	PWM (100 µl)	Alk. (100 µl)
V 10 T ₁	-	0.6	-	1.3	-
T ₂	-	2.5	-	3.6	-
T ₃	-	1.6	-	1.2	-
V 15 T ₁	-	1.06	-	1.2	-
T ₃	-	1.33	-	0.55	-
V 31 T ₂	-	1.57	1.69	3.58	-
T ₄	1.01	0.92	-	1.48	-
V 32 T ₃	1.5	0.91	1.38	1.06	-
T ₄	1.72	1.80	-	1.69	-
V 33 T ₁	-	9.44	8.02	3.96	-
T ₃	-	1.62	-	1.35	1.45
V 34 T ₂	6.41	4.81	8.94	6.24	4.23
V 35 T ₂	2.66	-	2.29	0.86	2.72
V 36 T ₁	2.43	-	-	2.37	1.22
T ₂	0.56	0.37	5.01	1.19	5.82
V 37 T ₂	1.26	-	1.08	1.16	1.79
T ₃	1.21	-	0.38	1.16	0.58
$\bar{x}$	2.08	2.19	3.59	1.99	2.54
SD	1.75	2.44	3.31	1.49	1.87
V	3.06	5.98	11.00	2.24	3.49

Tab. 6

Echinacea in alkoholischer Lösung, PWM und Alkohol (35 %ig)

Stimulations-Indices an Tag 6

Echinacea-Konz.: 0.1 g/ml

V= Versuch

T= Tier

Ech.- Konz.:	50 µl	100 µl	200 µl	PWM (100 µl)	Alk. (100 µl)
V 15 T ₁	-	1.1	-	4.62	-
T ₂	-	0.56	0.59	0.96	-
T ₄	-	0.45	-	0.85	-
V 31 T ₂	-	1.75	-	3.95	-
T ₄	-	1.17	1.71	0.99	-
V 32 T ₃	0.72	0.76	-	1.25	-
T ₄	-	5.54	-	3.78	-
V 33 T ₁	-	1.35	1.08	1.81	-
V 34 T ₁	2.07	1.33	-	6.72	2.74
T ₂	2.04	2.41	8.7	6.31	6.01
T ₄	0.77	1.37	1.09	3.01	1.03
V 35 T ₁	5.4	9.0	-	3.59	1.35
T ₂	0.4	-	2.67	0.79	1.94
T ₄	1.25	-	1.12	1.11	1.22
V 37 T ₁	1.99	-	0.79	3.08	5.65
$\bar{x}$	1.69	2.23	2.01	2.91	2.94
SD	1.54	2.52	2.59	1.92	1.97
V	2.37	6.35	6.73	3.71	3.91

Tab. 7

Echinacea in alkoholischer Lösung, PWM und Alkohol (35 %ig)Zellzahlen($\times 10^6$ /ml) an Tag 3

Echinacea-Konz.: 0.1 g/ml

V= Versuch

T= Tier

Ech.- Konz.:	50 μ l	100 μ l	200 μ l	PWM (100 μ l)	Alk. (100 μ l)	0-Wert
V 10 T ₁	-	3.68	-	8.4	-	8.12
T ₂	-	4.92	-	2.36	-	8.68
T ₃	-	3.16	-	7.12	-	5.36
V 15 T ₁	-	4.92	-	5.52	-	4.48
T ₃	-	9.92	-	10.48	-	2.8
V 31 T ₂	-	5.92	11.32	5.44	-	4.56
T ₄	6.6	5.6	-	9.28	-	10.2
V 32 T ₃	5.4	5.0	11.68	8.36	-	3.92
T ₄	7.76	12.92	-	11.08	-	7.24
V 33 T ₁	-	9.24	12.04	13.32	-	12.52
T ₃	-	7.4	-	8.24	8.1	16.68
V 34 T ₂	7.92	6.48	8.08	4.68	6.6	10.96
V 35 T ₂	6.84	-	9.12	5.0	4.48	5.52
V 36 T ₁	10.36	-	-	12.67	7.3	7.52
T ₂	5.48	6.2	12.76	4.72	5.72	6.56
V 37 T ₂	9.72	-	9.96	6.36	11.72	9.84
T ₃	9.4	-	14.0	8.44	12.28	11.36
$\bar{x}$	7.72 ^a	6.56 ^a	11.12 ^b	7.73 ^a	8.02 ^{ab}	8.01 ^{ab}
SD	1.81	2.71	1.95	3.01	2.94	3.06
V	3.28	7.39	3.82	9.09	8.70	13.02

a, b, signifikant unterschiedlich ($p < 0.05$)

Tab. 8

Echinacea in alkoholischer Lösung, PWM und Alkohol (35 %ig)Zellzahlen ($\times 10^6/\text{ml}$) an Tag 6

Echinacea-Konz.: 0.1 g/ml

V= Versuch

T= Tier

Ech.- Konz.:		50 μl	100 μl	200 μl	PWM (100 μl)	Alk. (100 μl)	0-Wert
V 15	T ₁	-	1.64	-	1.24	-	1.1
	T ₂	-	1.08	1.72	2.4	-	1.92
	T ₄	-	2.72	-	2.16	-	1.84
V 31	T ₂	-	1.72	-	3.94	-	1.12
	T ₄	-	6.08	13.24	2.52	-	2.96
V 32	T ₃	2.0	3.9	-	3.32	-	2.08
	T ₄	-	2.1	-	2.58	-	1.62
V 33	T ₁	-	2.38	19.2	4.26	-	4.72
V 34	T ₁	3.2	4.18	-	1.94	1.28	1.46
	T ₂	2.06	3.32	13.0	2.72	2.04	2.22
	T ₄	1.84	1.8	10.64	4.48	1.23	2.16
V 35	T ₁	3.24	3.16	-	2.96	3.16	4.48
	T ₂	3.24	-	2.04	2.7	8.84	10.04
	T ₄	2.0	-	1.08	2.36	4.1	2.36
V 37	T ₁	2.52	-	10.68	4.24	2.84	2.0
	T ₃	1.06	-	13.88	5.26	3.12	1.2
$\bar{x}$		2.35 ^a	2.84 ^a	9.49 ^b	3.06 ^a	3.32 ^a	2.70 ^a
SD		0.75	1.39	6.41	1.08	2.43	2.22
V		0.57	1.94	41.16	1.17	5.93	4.93

a, b, signifikanter Unterschied ($p < 0.05$)

Tab. 9

Influx^R in wässriger Lösung und PWM

Stimulations-Indices an Tag 3

V= Versuch

T= Tier

Influx-Konz.:	50 µl	100 µl	200 µl	PWM (100 µl)
V 24 T ₁	1.42	0.41	5.21	0.45
T ₂	1.12	0.93	0.99	1.27
T ₃	2.93	1.80	2.15	0.80
T ₄	-	1.12	-	1.10
V 25 T ₁	7.30	13.20	1.60	11.20
T ₂	1.71	0.79	1.25	1.07
V 26 T ₁	4.34	1.24	-	4.34
T ₂	-	3.13	1.50	6.79
V 27 T ₁	0.57	0.42	1.24	0.77
T ₂	-	0.66	-	1.12
T ₃	-	-	1.35	1.59
V 28 T ₁	7.88	9.10	2.31	3.92
T ₂	-	0.27	-	1.22
T ₄	-	2.24	-	3.81
$\bar{x}$	3.41	2.71	1.95	2.82
SD	2.83	3.91	1.29	3.03
V	8.02	15.36	1.67	9.18

Tab. 10

Influx^R in wässriger Lösung und PWM

Stimulations-Indices an Tag 6

V= Versuch

T= Tier

Influx- Konz.:	50 µl	100 µl	200 µl	PWM (100 µl)
V 17 T ₂	2.50	-	1.70	18.90
T ₃	1.50	-	2.45	6.81
T ₄	1.83	3.71	2.82	7.52
V 24 T ₁	1.04	0.73	0.67	1.18
T ₂	0.50	2.29	3.87	0.89
T ₃	0.64	1.12	-	0.95
T ₄	-	1.97	-	0.63
V 25 T ₂	1.19	0.95	1.24	1.57
T ₃	0.63	-	0.28	2.10
V 26 T ₁	2.37	-	-	3.05
V 27 T ₂	-	2.68	-	7.60
T ₄	1.58	4.16	3.80	5.32
V 28 T ₂	0.62	0.81	-	6.45
T ₄	1.51	0.91	-	3.32
V 29 T ₁	3.53	1.03	-	4.10
T ₂	-	2.78	1.36	6.00
T ₃	14.47	7.04	23.80	12.86
T ₄	2.42	-	-	3.04
$\bar{x}$	2.42	2.32	4.19	5.12
SD	3.44	1.82	6.99	4.67
V	11.85	3.31	48.94	21.89

Tab. 11

Influe_x in wässriger Lösung und PWMZellzahlen ($\times 10^6$ /ml) an Tag 3

V= Versuch

T= Tier

Influe _x - Konz.:	50 μ l	100 μ l	200 μ l	PWM(100 μ l)	0-Wert
V 24 T ₁	7.16	7.76	7.52	8.24	8.92
T ₂	5.16	2.12	3.80	3.20	2.04
T ₃	4.76	4.92	2.72	8.92	5.56
T ₄	-	18.72	-	17.40	12.08
V 25 T ₁	13.04	11.12	13.84	14.20	13.08
T ₂	9.44	6.80	-	17.40	12.08
V 25 T ₁	13.04	11.12	13.84	14.20	13.08
T ₂	9.44	6.80	6.76	8.76	6.96
V 26 T ₁	4.16	3.56	-	4.04	3.88
T ₂	-	8.76	10.16	6.60	10.36
V 27 T ₁	14.76	17.68	16.24	17.44	15.29
T ₂	-	12.96	-	13.08	17.76
T ₃	-	-	11.88	22.04	16.64
V 28 T ₁	0.14	8.40	8.96	10.12	8.36
T ₂	-	9.00	-	6.76	10.08
T ₄	-	15.20	-	10.68	13.96
$\bar{x}$	7.32	9.76	9.04	10.46	10.82
SD	4.86	5.17	4.49	5.71	5.42
V	23.62	26.85	20.20	32.70	29.45

Tab. 12

InflueX^R in wässriger Lösung und PWMZellzahlen($\times 10^6$ /ml) an Tag 6

V= Versuch

T= Tier

InflueX-Konz.:	50 μ l	100 μ l	200 μ l	PWM (100 μ l)	0-Wert
V 17 T ₂	0.44	-	0.60	3.06	0.82
T ₃	0.29	-	0.38	1.20	0.28
T ₄	0.32	0.18	0.64	4.80	0.75
V 24 T ₁	2.64	1.76	2.48	1.68	1.24
T ₂	1.24	1.08	2.20	1.64	3.68
T ₃	2.00	3.24	-	3.00	1.84
T ₄	-	2.16	-	2.24	3.20
V 25 T ₂	2.60	2.72	1.68	3.08	1.96
T ₃	1.52	-	1.28	2.44	1.40
V 26 T ₁	2.24	-	-	2.30	2.26
V 27 T ₂	-	1.60	-	11.12	1.40
T ₄	1.04	1.38	1.30	10.68	1.06
V 28 T ₂	1.60	1.14	-	2.10	1.20
T ₄	2.96	3.94	-	4.62	3.88
V 29 T ₁	3.98	1.99	-	4.72	2.99
T ₂	-	6.32	1.98	6.91	4.70
T ₃	4.33	5.02	4.76	5.21	6.03
T ₄	3.26	-	-	2.87	3.31
$\bar{x}$	2.03 ^a	2.50 ^{ab}	1.73 ^a	4.09 ^b	2.33 ^a
SD	1.27	1.72	1.27	2.88	1.55
V	1.62	2.98	1.63	8.32	2.40

a, b, signifikant unterschiedlich ($p < 0.05$)

Tab.13

Influtex^R injectabile und PWM

Stimulations-Indices an Tag 3

V= Versuch

T= Tier

Influtex-							PWM
Konz.:		50 µl	100 µl	200 µl	500 µl	1000 µl	(100 µl)
V 5	T ₂	-	-	-	1.73	2.73	2.45
	T ₃	-	-	-	0.45	0.66	1.24
	T ₄	-	-	-	0.57	0.44	0.94
V 6	T ₁	-	0.61	2.44	-	-	1.12
	T ₄	-	0.73	1.85	-	-	4.30
V 7	T ₁	3.20	1.32	1.77	0.74	-	1.89
	T ₂	0.88	0.86	0.52	0.71	-	1.35
	T ₃	1.41	0.77	2.81	1.19	-	1.77
	T ₄	1.65	1.03	-	0.47	-	1.77
V 11	T ₁	-	0.60	0.96	-	-	4.70
	T ₂	1.02	0.29	0.82	0.86	-	3.38
	T ₃	0.67	0.93	0.58	0.31	-	1.12
	T ₄	1.52	0.91	0.88	-	-	2.28
V 12	T ₂	-	0.65	1.30	-	-	2.68
	T ₃	-	0.54	2.85	-	-	4.19
	T ₄	-	1.82	2.47	-	-	1.84
V 14	T ₁	2.06	0.86	1.52	-	-	3.06
	T ₂	-	-	0.54	1.04	-	0.99
	T ₃	-	0.45	1.14	0.97	-	0.64
	T ₄	0.52	-	0.81	-	-	1.22
$\bar{x}$		1.43 ^a	0.82 ^b	1.45 ^a	0.82 ^{bc}	1.27 ^{abd}	2.14 ^d
SD		0.82	0.37	0.81	0.40	1.26	1.21
V		0.68	0.13	0.66	0.16	1.59	1.47

a, b, signifikant unterschiedlich (p < 0.05)

Tab. 14

Influtex^R injectabile und PWM

Stimulations-Indices an Tag 6

V= Versuch

T= Tier

Influtex- Konz.:		50 µl	100 µl	200 µl	500 µl	1000 µl	PWM (100 µl)
V 5	T ₂	-	-	-	1.96	0.72	4.64
	T ₃	-	-	-	0.27	1.15	6.41
	T ₄	-	-	-	0.85	1.50	4.09
V 6	T ₁	-	1.71	3.30	-	-	2.87
	T ₄	-	1.23	1.42	-	-	22.04
V 11	T ₂	1.10	1.20	1.10	-	-	9.74
	T ₃	-	0.60	0.66	1.48	-	5.12
	T ₄	0.94	2.40	1.49	1.64	-	16.21
V 12	T ₂	-	0.61	0.83	-	-	2.34
	T ₃	-	0.79	1.41	-	-	8.13
	T ₄	-	0.89	1.32	-	-	15.12
V 13	T ₁	0.88	-	0.44	0.92	-	0.38
	T ₂	1.25	-	1.61	0.91	-	4.63
	T ₃	1.34	1.23	1.02	0.99	-	1.01
	T ₄	0.52	-	0.59	0.58	-	2.93
$\bar{x}$		1.00 ^a	1.21 ^a	1.39 ^a	1.06 ^a	1.12	7.03 ^b
SD		0.29	0.55	0.84	0.53	0.39	6.23
V		8.72	0.30	0.71	0.28	0.15	38.87

a, b, signifikant unterschiedlich (p < 0.05)

Tab. 15

Influe^Rx injectabile und PWMZellzahlen($\times 10^6/\text{ml}$) an Tag 3

V= Versuch

T= Tier

Influe ^R x- Konz.:		50 μl	100 μl	200 μl	500 μl	1000 μl	PWM (100 μl)	0-Wert
V 5	T ₂	-	-	-	1.30	0.10	9.10	8.80
	T ₃	-	-	-	1.84	2.26	6.60	7.41
	T ₄	-	-	-	0.36	0.90	5.82	1.62
V 6	T ₁	-	1.94	2.78	-	-	4.92	4.76
	T ₄	-	12.52	7.76	-	-	14.28	8.38
V 7	T ₁	2.00	1.32	3.02	3.36	-	2.54	2.84
	T ₂	4.61	1.90	4.16	6.12	-	4.74	3.62
	T ₃	10.48	13.40	12.68	23.08	-	19.36	16.44
	T ₄	8.64	7.24	-	17.68	-	15.16	12.60
V 11	T ₁	-	6.52	6.72	-	-	10.48	7.36
	T ₂	1.88	3.12	4.96	8.76	-	6.48	4.00
	T ₃	1.36	1.68	2.06	3.12	-	5.08	4.20
	T ₄	2.01	1.88	2.32	-	-	5.24	3.16
V 12	T ₂	-	0.24	0.24	-	-	0.66	0.83
	T ₃	-	1.18	1.80	-	-	1.99	2.50
	T ₄	-	2.18	2.61	-	-	3.90	6.23
V 14	T ₁	1.64	1.21	2.24	-	-	5.02	4.68
	T ₂	-	-	1.01	2.10	-	6.08	5.04
	T ₃	-	0.94	3.02	2.81	-	5.11	4.70
	T ₄	1.64	-	0.96	-	-	3.80	3.64
$\bar{x}$		3.80 ^{ab}	3.81 ^{ab}	3.64 ^a	6.41 ^{ab}	1.08 ^{ab}	6.81 ^b	5.63 ^{ab}
SD		3.43	4.19	3.14	7.38	1.09	4.70	3.75
V		11.76	17.59	9.87	54.58	1.19	22.09	14.10

a, b, signifikant unterschiedlich ($p < 0.05$)

Tab. 16

Influe^Rx injectabile und PWMZellzahlen($\times 10^6$ /ml) an Tag 6

V= Versuch

T= Tier

Influe ^R x- Konz.:		50 μ l	100 μ l	200 μ l	500 μ l	1000 μ l	PWM (100 μ l)	0-Wert
V 5	T ₂	-	-	-	0.98	1.14	1.46	0.32
	T ₃	-	-	-	8.12	0.64	1.24	0.36
	T ₄	-	-	-	6.03	8.21	0.32	0.24
V 6	T ₁	-	0.05	0.16	-	-	0.26	0.64
	T ₄	-	0.20	0.21	-	-	3.20	0.23
V 11	T ₂	2.57	0.07	0.05	-	-	6.23	0.14
	T ₃	-	0.74	1.40	8.16	-	0.41	0.06
	T ₄	0.46	0.64	0.62	6.16	-	8.64	0.88
V 12	T ₂	-	1.21	1.42	-	-	3.67	1.38
	T ₃	-	1.20	0.84	-	-	5.04	1.48
	T ₄	-	2.02	1.54	-	-	4.38	1.02
V 13	T ₁	1.08	-	1.12	3.01	-	1.76	2.04
	T ₂	0.21	-	0.44	0.54	-	0.88	1.72
	T ₃	1.76	1.56	1.76	0.64	-	0.41	0.60
	T ₄	0.64	-	1.34	1.26	-	1.80	1.12
$\bar{x}$		1.12	0.80	0.85	3.87	3.32	2.21	0.76
SD		0.89	0.67	0.59	3.23	4.22	2.29	0.61
V		0.80	0.44	0.35	10.45	17.87	5.28	0.38

Herrn Professor Dr. U. Lösch spreche ich hiermit meinen besonderen Dank aus für die Überlassung des Themas und für seine Unterstützung und instruktive Anleitung bei dieser Arbeit.

Zugleich danke ich auch Herrn Professor Dr. M. Merkschlager und Herrn Professor Dr. H. Zucker für den zur Verfügung gestellten Arbeitsplatz.

Für Anregung und Anleitung zur vorliegenden Arbeit sowie das große Entgegenkommen bei der Anfertigung bedanke ich mich bei Frau D. Böhringer.

Frau Dr. I. Schraner danke ich herzlich für ihre große Hilfsbereitschaft.

Auch bei allen anderen Mitarbeitern des Labor Lösch bedanke ich mich, insbesondere bei Frau L. Mantel.

Frau M. Schepe danke ich für das Anfertigen der Zeichnungen.

Lebenslauf

24. 07. 1956 Geboren in München als Tochter des Dr. jur. Karl-Leon Du Moulin Eckart und seiner Ehefrau Eva, geb. Kusche
- 1962-1965 Rotbuchenvolksschule, München
- 1965-1976 Städtisches Theodolinden-Gymnasium, München
- 1976-1983 Studium der Tiermedizin an der Universität München
20. 04. 1983 Staatsexamen
- 1983-1986 Anfertigung der vorliegenden Dissertation am Institut für Physiologie, Physiologische Chemie und Ernährungsphysiologie der Tierärztlichen Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität München

